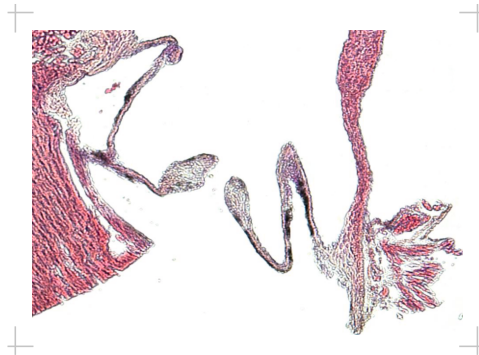


SOFIA KLEIN

Die Rolle von Pannexin-1 in einem akuten murinen myokardialen Modell der Ischämie und Reperfusion

Untersuchungen an der
Pannexin-1-defizienten Maus



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Justus-Liebig-Universität zu Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

und

der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie
des Universitätsklinikums Düsseldorf

Betreuerin: Prof. Dr. med. Birgit C. Donner

**Die Rolle von Pannexin-1 in einem
akuten murinen myokardialen Modell
der Ischämie und Reperfusion**

Untersuchungen an der Pannexin-1-defizienten Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sofia Klein

Tierärztin aus Bonn

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

Vorsitzender und 1. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Geyer
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Birgit C. Donner
Prüfer: Prof. Dr. Martin Diener

Tag der Disputation: 10. Mai 2017

Der Weg ist das Ziel.

(Konfuzius)

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Petric, S.^a; Klein, S.^a; Dannenberg, L.; Lahres, T.; Clasen, L.; Schmidt, K.G.; Ding, Z.; Donner, B.C. (2016):

Pannexin-1 deficient mice have an increased susceptibility for atrial fibrillation and show a QT-prolongation phenotype.

Cell. Physiol. Biochem. 38(2):487-501

^a Geteilte Erstautorenschaft

Zusammenfassung

Pannexin-1 (Panx1) ist ein Ionenkanal und gehört neben Pannexin-2 (Panx2) und Pannexin-3 (Panx3) zu einer Gruppe von drei Membranproteinen, die im Jahr 2000 erstmals beschrieben wurden. Aufgrund ihrer Struktur und Funktion ordnete man sie zunächst den *Gap Junction*-Proteinen zu. Spätere Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei den Pannexinen jedoch um Transmembranproteine handelt, die den Stoffaustausch zwischen dem Zytosol einer Zelle und dem extrazellulären Raum ermöglichen.

Panx1 wird ubiquitär exprimiert. Aufgrund seiner elektrophysiologischen Eigenschaften wird ihm eine Funktion im Rahmen vieler zellulärer Prozesse zugeschrieben. So ist der Panx1-Kanal u.a. an der Steuerung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase und der Weiterleitung von Ca^{2+} -Wellen über mehrere Zellen hinweg beteiligt, interagiert mit purinergen Rezeptoren und initiiert auf diese Weise inflammatorische und apoptotische Prozesse.

Im Herz-Kreislauf-System konnte bisher nachgewiesen werden, dass Panx1 zur Blutdruckregulation beiträgt und durch die Aktivierung myokardialer Fibroblasten die Bildung einer kardialen Fibrose einleitet. Diese Ergebnisse sowie die Auslösung Ca^{2+} -unabhängiger Aktionspotentiale an isolierten Kardiomyozyten deuteten darüber hinaus auf einen Einfluss des Proteins auf kardiale Arrhythmien hin.

Gegenstand des vorliegenden Projektes ist die Rolle von Panx1 im Rahmen einer experimentell ausgelösten Ischämie und Reperfusion am *In-vivo*-Modell der *Panx1*-defizienten Maus. Zu diesem Zweck wurden bei acht *Panx1*^{+/+}- und zehn *Panx1*^{-/-}-Mäusen subkutan EKG-Transmitter implantiert und vor und nach Ischämie 24h-Elektrokardiogramme aufgezeichnet. Aus diesen konnten anschließend Arrhythmien detektiert und die einzelnen Zeiten- und Streckenabschnitte des EKGs, die Herzratenvariabilität sowie die Herzfrequenz-turbulenz berechnet werden. Des Weiteren wurden vor und nach der Ischämie echokardiographische Untersuchungen durchgeführt, um die kardialen Funktionsparameter zu bestimmen. Die Ischämie und Reperfusion wurde im Sinne eines sog. *Closed-Chest*-Modells durchgeführt. Eine Katheterisierung über die rechte *Arteria carotis communis* mit dem Millar-Katheter stellte die systolischen und diastolischen Druckverhältnisse in der Aorta und im linken Ventrikel nach Ischämie

dar. Am Ende der Versuchsreihe wurden die Infarktgrößen planimetrisch bestimmt.

Die *Panx1*^{-/-}-Mäuse zeigten postischämisch signifikant mehr AV-Blöcke als die *Panx1*^{+/+}-Mäuse. Die Zeiten- und Streckenanalyse brachte eine hochsignifikant verlängerte QT_c-Zeit der *Panx1*^{-/-}-Mäuse hervor. Keine Signifikanzen zeigten sich beim Vergleich der HRV- und der HRT-Messwerte der *Panx1*^{+/+}- und *Panx1*^{-/-}-Mäuse. Gleiches galt für die echokardiographisch erhobenen Funktionsparameter. Diese verschlechterten sich jedoch, ebenso wie die HRV-Parameter, bei beiden Genotypen signifikant nach der Ischämie und Reperfusion. Die Untersuchung mit dem Millar-Katheter ergab keine Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen. Ebenso konnten hinsichtlich der Infarktgrößen der *Panx1*^{+/+}- und *Panx1*^{-/-}-Mäuse keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Histologisch fand sich keine veränderte Herzstruktur bei fehlender *Panx1*-Expression.

Zusammenfassend konnten Hinweise auf eine Reizleitungsstörung und eine signifikante Repolarisationsstörung der *Panx1*-defizienten Tiere nachgewiesen werden. Im Rahmen eines Infarktgeschehens hat die Deletion von *Panx1* keinen Einfluss auf die Klinik, Funktion und die elektrophysiologischen Parameter. Die vorliegende Arbeit trägt damit zum besseren Verständnis der kardialen Funktion von *Panx1* bei.

Summary

Pannexin-1 (Panx1) is an ion channel protein first described in 2000. It belongs to the same group of transmembrane proteins as Pannexin-2 (Panx2) and Pannexin-3 (Panx3). Initially they were categorized as *gap junction* proteins. However, later studies have shown that the pannexins form transmembrane protein channels which allow the exchange of ions, ATP and other molecules between cytosol and extracellular space.

Panx1 is expressed ubiquitously and, due to its electrophysiological properties, owns several cell-specific functions. Examples are the control of the intracellular calcium-homeostasis and the propagation of calcium waves across several cells, the interaction with purinergic receptors and the initiation of inflammatory and apoptotic processes. In the cardiovascular system, experiments showed that Panx1 contributes to blood pressure regulation and initiates cardiac fibrosis. These findings together with the induction of calcium-independent action potentials in isolated cardiomyocytes indicate the proteins' impact on cardiac arrhythmias.

This project focusses on the central role of Panx1 in an experimentally induced *in-vivo-closed-chest* ischemia and reperfusion model. For this purpose, ECG-transmitters were implanted subcutaneously into eight *Panx1*^{+/+}- and ten *Panx1*^{-/-}-mice and 24h-ECGs were recorded before and after ischemia. Based on these electrocardiograms, cardiac arrhythmias, the different periods and sections of the heartbeats, the heart rate variability and the heart rate turbulence were detected. A echocardiographic examination provided information on the cardiac function. At the end of each experiment, blood pressure data from the right *arteria carotis communis* and the left cardiac ventricle were collected via a Millar-catheter. Furthermore, infarct sizes were measured by infarct planimetry. In comparison with *Panx1*^{+/+}-mice, *Panx1*^{-/-}-mice showed significantly more AV blocks and a highly significant prolonged QT_c-time after ischemia. No differences could be detected comparing the HRV and the HRT of both genotypes as well as the cardiac function. However, both genotypes showed significantly reduced HRV and echocardiographic parameters after ischemia and reperfusion. The catheterization of the *arteria carotis communis* did not yield any different results between the genotypes. Furthermore, the infarct sizes of *Panx1*^{+/+}- and

Panx1^{-/-}-mice showed no differences and there was no hint at any modification of heart morphology in case of *Panx1*-deficiency.

In summary, there was no evidence of any conduction disturbance and any significant repolarization disorder in *Panx1*^{-/-}-mice. Obviously, *Panx1*-deficiency has no influence on the symptoms and on the function and electrophysiology in terms of myocardial infarction.

The work presented here therefore contributes to a better understanding of cardiac function of Panx1.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	XIII
Abbildungsverzeichnis	XVIII
Tabellenverzeichnis	XX
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Koronare Herzkrankheit und die Rolle der Pannexine	1
1.2 Kommunikation ist Alles: Der Stoffaustausch zwischen den Zellen.....	3
1.3 Pannexine – kleine Poren von großer Bedeutung	4
1.3.1 Struktur der Pannexine	4
1.3.2 Genexpression	6
1.3.3 Aktivierung und Funktionen von Panx1	7
1.3.3.1 Funktion im Rahmen der Kalziumausbreitung.....	8
1.3.3.2 Funktion im Rahmen von Inflammation und Apoptose	10
1.3.3.3 Funktion im Gehirn.....	11
1.3.3.4 Funktion im kardiovaskulären System	11
1.3.3.5 Regulation von Panx1	14
1.4 Die genetisch modifizierte Maus als Versuchsobjekt	15
1.4.1 Die Generierung transgener Mäuse.....	16
1.5 Ziel der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Systematischer und zeitlicher Aufbau der Versuchsreihe	20
2.2 Versuchstiere	21
2.2.1 Die <i>Panx1</i> -defiziente Maus	21
2.2.2 Genotypisierungen.....	23
2.2.2.1 DNA-Präparation	23
2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation der isolierten DNA.....	24
2.2.2.3 Gelelektrophorese	25
2.2.3 Tierhaltung	26
2.2.3.1 Zucht.....	26
2.2.3.2 Versuchstiere	27
2.2.3.3 Genehmigung.....	28

2.3 Funktionelle nicht-invasive Untersuchungen	
mittels Echokardiographie	28
2.3.1 Grundlagen	28
2.3.2 Durchführung	28
2.3.3 Auswertung	32
2.4 Durchführung einer Ischämie und Reperfusion	33
2.4.1 Hintergrund und Bedeutung des <i>Closed-Chest-Modells</i>	33
2.4.2 Anlage einer Ligatur um die LAD (Vor-OP)	33
2.4.3 Induktion der Ischämie bei geschlossenem Thorax	35
2.4.4 <i>Evans Blue</i> - und TTC-Färbung	
zur Vorbereitung einer Infarktplanimetrie	36
2.4.5 Infarktplanimetrie zur Ermittlung der Infarktgröße	37
2.5 Aufzeichnung eines telemetrischen Elektrokardiogramms	38
2.5.1 Das EKG - Grundlagen und Unterschiede	
zwischen Mensch und Maus	38
2.5.2 Aufbau der Messeinheit	41
2.5.3 Implantation von EKG-Transmittern	41
2.5.4 Aufzeichnung der 24h-EKGs	43
2.5.5 Manuelle Grundausswertung der 24h-EKGs	43
2.5.6 Arrhythmien-Detektion	44
2.5.7 Auswertung von Zeiten und Strecken	44
2.5.8 Ermittlung der <i>Heart Rate Variability</i>	47
2.5.8.1 Analyse der <i>Time Domain</i>	49
2.5.8.2 Analyse der <i>Frequency Domain</i>	51
2.5.9 Untersuchung der <i>Heart Rate Turbulence</i>	52
2.5.9.1 <i>Turbulence Onset</i> und <i>Turbulence Slope</i>	53
2.6 Invasive LV-Funktionsanalyse mittels Druck-Volumen-Katheter	55
2.6.1 Durchführung	55
2.6.2 Auswertung	58
2.7 Paraffineinbettung für die histologische Untersuchung	58
2.7.1 Vorbereitung für die Einbettung	58
2.7.2 Anfertigung der histologischen Schnitte	59
2.7.3 Färbung der histologischen Schnitte	59
2.7.4 Mikroskopie der histologischen Schnitte	59

2.8	Statistische Auswertung	60
3	Ergebnisse	69
3.1	Tierdaten	69
3.2	Ergebnisse der EKG-Auswertung	69
3.2.1	Ergebnisse der Arrhythmien-Detektion	69
3.2.2	Ergebnisse der Zeiten- und Streckenanalyse	72
3.2.3	Ergebnisse der <i>Heart Rate Variability</i>	74
3.2.4	Ergebnisse der <i>Heart Rate Turbulence</i> -Analyse nach myokardialer Ischämie	77
3.3	Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchung	79
3.4	Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Millar-Katheter	82
3.5	Ergebnisse der Infarktplanimetrie	83
3.6	Ergebnisse der Paraffineinbettungen	85
4	Diskussion	86
4.1	Diskussion der <i>Panx1^{-/-}</i> -Maus als transgenes Tiermodell	86
4.2	Diskussion der Methodik einer experimentellen Ischämie und Reperfusion	87
4.3	Diskussion der elektrophysiologischen Befunde	89
4.3.1	Diskussion der Arrhythmien bei <i>Panx1^{+/+}</i> - und <i>Panx1^{-/-}</i> -Mäusen	89
4.3.2	Diskussion der Zeiten- und Streckenanalyse	91
4.3.3	Diskussion der <i>Heart Rate Variability</i> im Rahmen der Ischämie und Reperfusion in <i>Panx1^{+/+}</i> - und <i>Panx1^{-/-}</i> -Mäusen	94
4.4	Diskussion der hämodynamischen Befunde	99
4.4.1	Echokardiographie	99
4.4.2	Diskussion der Untersuchungen mit dem Druck-Volumen-Katheter	101
4.5	Diskussion der Infarktplanimetrie	102
4.6	Diskussion der histologischen Befunde	103
4.7	Ausblick	105
5	Literaturverzeichnis	107
6	Eidesstattliche Erklärung	126
7	Danksagung	127

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. carotis communis</i>	<i>Arteria carotis communis</i> / Halsschlagader
<i>A. cerebri media</i>	<i>Arteria cerebri media</i> / Mittlere Gehirnschlagader
ACS	<i>Acute Coronary Syndrome</i> / Akutes Koronarsyndrom
<i>A. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> / Destilliertes Wasser
AF	Atemfrequenz
AG	Arbeitsgruppe
ANS	Autonomes Nervensystem
AoV Peak Vel	<i>Aortic Valve Peak Velocity</i> / Geschwindigkeit des Blutflusses über die Aortenklappe
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Block	Atrioventrikulärer Block
BP	Basenpaar(e)
bpm	<i>Beats Per Minute</i> / Schläge pro Minute
B-Mode	<i>Brightness Modulation-Mode</i> (Ultraschall)
BTA	Biologisch-technische(r) Assistent(in)
Ca ²⁺	Kalziumion(en)
CBX	Carbenoxolon
CO	<i>Cardiac Output</i> / Herzminutenvolumen
Cre-Rekombinase	<i>Cyclization Recombination</i> -Rekombinase
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cys-40	Cystein 40
Cys-346	Cystein 346
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
dP/dt _{max}	Max. Druckanstiegsgeschwindigkeit der Herzmuskulatur
dP/dt _{min}	Max. Erschlaffungsgeschwindigkeit der Herzmuskulatur

EF	<i>Ejection Fraction/</i> Ejektionsfraktion
EZM	Extrazelluläre Matrix
ES	Embryonale Stammzellen
EZR	Extrazellulärer Raum
FiO ₂	<i>Fraction Of Inspired Oxygen/</i> Inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FS	<i>Fractional Shortening/</i> Verkürzungsfraction
G	Gauge
HCL	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HF	Herzfrequenz
HHU	Heinrich-Heine-Universität
HRS	Herzrhythmusstörung(en)
HRT	<i>Heart Rate Turbulence/</i> Herzfrequenz-turbulenz
HRV	<i>Heart Rate Variability/</i> Herzfrequenz- variabilität oder Herzratenvariabilität
Hz	Hertz (SI-Einheit für die Frequenz)
I _{Ca(L)}	<i>Longlasting</i> L-Typ-Ca ²⁺ -Kanal
Il-6	Interleukin-6
I _{K(ACH)}	Acetylcholin-aktivierter K ⁺ -Kanal
I _{Ks}	<i>Slow-K⁺-Kanal (Delayed Rectifier)</i>
I _{Kr}	<i>Rapid-K⁺-Kanal (Delayed Rectifier)</i>
Il-1β	Interleukin-1β
i.p.	Intraperitoneal
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid (Operon-Induktor)
I _{to, f}	<i>Fast (Delayed Rectifier)</i> <i>Transient-Outward-K⁺-Kanal</i>
I _{to, s}	<i>Slow (Delayed Rectifier)</i> <i>Transient-Outward-K⁺-Kanal</i>
K ⁺	Kaliumion(en)
KGW	Körpergewicht

KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	<i>Knock-Out</i>
Kv	<i>Voltage-Dependent</i> K ⁺ -Kanal
Kvβ3	Untereinheit von K _v
LacZ-Gen	Gen des Laktose-Operons von <i>Escherichia coli</i> ; kodiert für das Enzym β-Galactosidase
LAD	<i>Left Anterior Descending Artery</i> / Proximale linke Koronararterie
LoxP-Stelle	<i>Locus of Crossing Over in Phage P1</i> / Erkennungssequenz für Rekombinasen
LVDP	<i>Left Ventricular Developed Pressure</i> / Linksventrikulär entwickelter Druck
LVEF	<i>Left Ventricular Ejection Fraction</i> / Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVEDV	<i>Left Ventricular Enddiastolic Volume</i> / Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVESV	<i>Left Ventricular Endsystolic Volume</i> / Linksventrikuläres endsystolisches Volumen
LVID; d	<i>Left Ventricular Internal Diameter (Diastole)</i> / Linksventrikulärer innerer Diameter (Diastole)
LVID; s	<i>Left Ventricular Internal Diameter (Systole)</i> / Linksventrikulärer innerer Diameter (Systole)
LVOT	<i>Left Ventricular Outflow Tract</i> / Linksventrikulärer Ausflusstrakt
lx	Lux (SI-Einheit für Beleuchtungsstärke)
M-Mode	<i>(Time) Motion-Mode</i> (Ultraschall)
MV A Vel	<i>Mitral Valve A Velocity</i> / Geschwindigkeit der A-Welle über die Mitralklappe
MV E Vel	<i>Mitral Valve E Velocity</i> / Geschwindigkeit der E-Welle über die Mitralklappe
MV E/A	<i>Mitral Valve E to A Ratio</i> / Verhältnis der E- zur A-Welle
MTA	Medizinisch-technische(r) Assistent(in)
Na ⁺	Natriumion

NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
N-Glykosylierung	Anbindung eines Zuckerrests an einen Asparaginrest
NO	Stickstoffmonoxid
<i>N. vagus</i>	<i>Nervus vagus</i>
O ₂	Sauerstoff
Panx1	Pannexin-1 (Kanalprotein)
<i>Panx1</i>	Kodierendes Gen für Panx1
<i>Panx1</i> ^{+/+}	Pannexin-1-Wildtyp
<i>Panx1</i> ^{-/-}	Pannexin-1-defiziente Maus
<i>Panx1</i> ^{-/-} <i>Panx2</i> ^{-/-}	Panx1- und -2-defiziente Maus
Panx2	Pannexin-2 (Protein)
<i>Panx2</i>	Kodierendes Gen für Panx2
Panx3	Pannexin-3 (Protein)
<i>Panx3</i>	Kodierendes Gen für Panx3
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> / Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Polymerase-Kettenreaktion
P _{max}	Maximaler Druck (systolischer Blutdruck)
P _{min}	Minimaler Druck (diastolischer Blutdruck)
pS	Picosiemens
PW-Doppler	<i>Pulsed-wave-Doppler</i> (Ultraschall)
Rho	<i>Ras Homologue</i> GTPase
RRI	RR-Intervall
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s.c.	<i>Subcutaneus</i> / subkutan
SD	<i>Standard Deviation</i> / Standardabweichung
SV	<i>Stroke Volume</i> / Schlagvolumen
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i> / Transformierender Wachstumsfaktor-β
TMD	Transmembrandomäne(n)

TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> Tumornekrosefaktor- α
TO	<i>Turbulence Onset</i>
TS	<i>Turbulence Slope</i>
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
VMTA	Veterinärmedizinisch-technische(r) Assistent(in)
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Mögliche Sekundärstruktur von Panx1 (a) mit zwei extrazellulären Cysteinresten (*) und Glykosylierung (roter Pfeil) im Vergleich zu der der Connexine (b).....	5
Abbildung 2:	Mögliche Rolle von Panx1 im Rahmen der Initiierung und Weiterleitung einer Ca^{2+}-Welle.....	9
Abbildung 3:	Panx1-vermittelte ATP-Freisetzung aus Erythrozyten und dadurch initiierte Vasodilatation	12
Abbildung 4:	Herstellung transgener Mäuse	18
Abbildung 5:	Schematischer Aufbau der Versuchsreihe	21
Abbildung 6:	Bandendarstellung nach der Gelelektrophorese.....	26
Abbildung 7:	Positionierung des Versuchstieres auf dem Elektroden-Kontaktpad	29
Abbildung 8:	Darstellung des Herzens im B-Mode der langen Achse	29
Abbildung 9:	Positionierung des Schallkopfs im parasternalen Kurzachsenschnitt.....	30
Abbildung 10:	Darstellung des Herzens im B-Mode der kurzen Achse.....	30
Abbildung 11:	Position des Schallkopfes beim apikalen Vierkammerblick	31
Abbildung 12:	Infarktplanimetrie mit der DISKUS-Software.....	37
Abbildung 13:	Schematische Darstellung des Aktionspotentials ventrikulärer Myozyten eines erwachsenen Menschen (links) im Vergleich mit dem einer Maus (rechts).....	39
Abbildung 14:	Vergleich zwischen einem humanen (1) und murinen (2) EKG.....	40
Abbildung 15:	Aufbau der Messeinheit	41
Abbildung 16:	Fotographische Demonstration der Transmitter-Implantation	42
Abbildung 17:	Schematische Darstellung der Analysen pro Tier auf Basis der 24h-EKG-Aufzeichnung.....	44
Abbildung 18:	Voreinstellungen im Analysemodul <i>ECG Analysis</i> von <i>LabChart Pro</i>	45
Abbildung 19:	Ausschnitt aus dem Analysemodul <i>ECG Averaging View</i>.....	46
Abbildung 20:	Schema des Wechselspiels zwischen Parasympathikus und Sympathikus zur kardiovaskulären Regulation (sympathovagale Balance)..	48
Abbildung 21:	In <i>LabChart Pro</i> manuell festgelegte Grenzen für die HRV-Analyse in der <i>Time Domain</i>-Analysefunktion	50
Abbildung 22:	Beispiel für die Festlegung des Schwellenwertes zur R-Zackendetektion in <i>LabChart Pro</i>.....	50

Abbildung 23: Manuelle Voreinstellung der Frequenzbänder in <i>LabChart Pro</i>	51
Abbildung 24: Bezeichnung der Intervalle um eine Ventrikuläre Extrasystole	54
Abbildung 25: Photographische Darstellung der Millar-Katheter-Untersuchung	56
Abbildung 26: Der Druck-Volumen-Katheter am Tier	57
Abbildung 27: Positionierung des Druck-Volumen-Katheters im linken Ventrikel	57
Abbildung 28: Photographische Darstellung von A) Rotationsmikrotom mit eingespanntem Paraffinblock und B) Wasserbad mit darin enthaltenen Schnitten	59
Abbildung 29: Pathologien im präischämischen Mäuse-EKG	70
Abbildung 30: Präischämisches (A) und postischämisches (B) EKG vom gleichen Tier mit deutlich sichtbarer monophasisch deformierter ST-Strecke (x) und R-Zacken-Verlust	71
Abbildung 31: Pathologien im postischämischen Mäuse-EKG beider Genotypen	71
Abbildung 32: Vergleich der durchschnittlichen Anzahl von AV-Blockierungen im postischämischen EKG	72
Abbildung 33: Graphische Darstellung der Differenz zwischen den QRS- und den QT-Intervallen (JT-Zeit) beider Genotypen	74
Abbildung 34: Graphische Darstellung der Ergebnisse für den <i>Turbulence Onset</i> (TO) beider Genotypen	78
Abbildung 35: Graphische Darstellung der Ergebnisse für den <i>Turbulence Slope</i> (TS) beider Genotypen	78
Abbildung 36: Graphische Darstellung der Infarktgrößen nach TTC-Färbung	84
Abbildung 37: Graphische Darstellung der Größe der <i>Area At Risk</i> (AAR)	84
Abbildung 38: Herzschnitt (quer) auf Mitte der Ventrikel	85
Abbildung 39: Trikuspidalklappe	85
Abbildung 40: Aortenklappe (Bildmitte) und Teile der Vorhöfe (links und rechts im Bild)	85
Abbildung 41: Graphische Darstellung der LAD mit zwei typischen Verteilungsmustern	89
Abbildung 42: Vergleich des Aktionspotentials eines Menschen (links) mit dem einer Maus (rechts)	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Amplifikationsschema der PCR-Maschine	25
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Materialien für die Zucht und Genotypisierungen.....	61
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien für die Genotypisierungen.....	61
Tabelle 4: Verwendete Geräte und Materialien für die Ischämie und Reperfusion.....	62
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Medikamente für die Ischämie und Reperfusion.....	63
Tabelle 6: Verwendete Geräte und Materialien für die Evan`s Blue- und TTC-Färbung sowie die Infarktplanimetrie ..	63
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Medikamente für die Evan`s Blue- und TTC-Färbung sowie die Infarktplanimetrie ..	64
Tabelle 8: Verwendete Geräte und Materialien für die EKG-Aufzeichnung	64
Tabelle 9: Verwendete Geräte und Materialien für die Echokardiographie	65
Tabelle 10: Verwendete Chemikalien und Medikamente für die Echokardiographie	65
Tabelle 11: Verwendete Geräte und Materialien für die Katheter-Untersuchung.....	66
Tabelle 12: Verwendete Chemikalien und Medikamente für die Katheter-Untersuchung.....	66
Tabelle 13: Verwendete Geräte und Materialien für die Paraffineinbettungen.....	66
Tabelle 14: Verwendete Chemikalien für die Paraffineinbettungen.....	67
Tabelle 15: Verwendete Software für die statistische Auswertung	68
Tabelle 16: Anzahl der Tiere in den einzelnen Methoden jeder Versuchsreihe	69
Tabelle 17: Durchschnittliche Anzahl präischämisch aufgetretener Atrioventrikulärer Blockierungen und Ventrikulärer Extrasystolen	70
Tabelle 18: Durchschnittliche Anzahl postischämisch aufgetretener Atrioventrikulärer Blockierungen und Ventrikulärer Extrasystolen	72
Tabelle 19: Ergebnisse der Zeiten- und Streckenauswertung	73
Tabelle 20: Differenz zwischen QT- und QRS-Abschnitt (sog. JT-Zeit)	73
Tabelle 21: Ergebnisse der Zeitbereichsanalyse vor und nach Ischämie: Vergleich der Genotypen untereinander.....	75
Tabelle 22: Ergebnisse der Zeitbereichsanalyse.....	75

Tabelle 23: Ergebnisse der Frequenzbereichsanalyse vor und nach Ischämie: Vergleich der Genotypen untereinander	76
Tabelle 24: Ergebnisse der Frequenzbereichsanalyse	76
Tabelle 25: Ergebnisse des Turbulence Onset (TO) und des Turbulence Slope (TS) beider Genotypen	78
Tabelle 26: Darstellung der echokardiographisch erhobenen systolischen Funktionsparameter	81
Tabelle 27: Darstellung der echokardiographisch erhobenen diastolischen Funktionsparameter	81
Tabelle 28: Mittels Millar-Katheter erhobene Druckwerte aus der Aorta und dem linken Ventrikel.....	83

1 Einleitung

1.1 Die Koronare Herzkrankheit und die Rolle der Pannexine

Die Koronare Herzkrankheit (KHK) stellt nach den Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den zivilisierten Ländern dar (Piper, 2012, S.155). Es handelt sich hierbei um die klinische Manifestation einer Arteriosklerose, d.h. verschiedener Formen einer degenerativen Veränderung arterieller Gefäße (Renz-Polster *et* Krautzig, 2012, S.60). In den meisten Fällen manifestiert sich diese als sog. „atheromatöse Arteriosklerose“ (Renz-Polster *et* Krautzig, 2012, S.197) der Koronararterien. Durch Entzündungsprozesse, fibröse Plaquebildung und Stenosierung wird die Koronardurchblutung und damit die Eigenversorgung des Herzmuskels reduziert. Als Folge kommt es zu einem Missverhältnis zwischen einem erniedrigten Sauerstoffangebot und erhöhten Sauerstoffbedarf.

Ein akuter Myokardinfarkt gilt als „Spitze des Eisbergs KHK“ und wird gemeinsam mit der *Angina pectoris* und dem plötzlichen Herztod unter dem Begriff Akutes Koronarsyndrom (ACS) zusammengefasst (Renz-Polster *et* Krautzig, 2012, S.70). In den meisten Fällen entsteht er durch die Ruptur eines atheromatösen Plaques oder des darüber liegenden Endothels, was zur umschriebenen Thrombenbildung mit anschließendem Gefäßverschluss, Zelltod und Infarktbildung führt (Odeberg *et al.*, 2016).

In Deutschland waren Herz-Kreislauf-Erkrankungen im Jahr 2014, noch vor den Krebserkrankungen, für 38,9 % (insgesamt 338.056 der 868.356 Verstorbenen) der Sterbefälle verantwortlich. Davon verstarben 50.104 Personen an einem Herzinfarkt (Statistisches Bundesamt). Insbesondere ab dem 50. Lebensjahr ist ein Häufigkeitsanstieg zu verzeichnen (Piper, 2012, S.155): 2014 waren 92% der Verstorbenen älter als 65 Jahre (Statistisches Bundesamt).

Aber: Der Tod durch eine der Formen des ACS trifft nicht nur Erwachsene, bei denen zahlreiche Risikofaktoren (nicht Kausalfaktoren) wie bspw. Nikotinkonsum, Hypertonie und Übergewicht durch die Entwicklung einer atheromatösen Arteriosklerose die Entstehung einer erworbenen KHK begünstigen (Zhu *et al.*, 2016) Auch Neugeborene und Kinder können durch die Entwicklung eines Myokardinfarkts versterben. Bei ihnen geschieht dies im Rahmen angeborener Herzerkrankungen wie z.B. dem Bland-White-Garland-Syndrom (Callaghan *et*

al., 2012), durch postoperative Koronarstenosen nach der Korrektur der Transposition großer Arterien (Tsujii *et al.*, 2016) oder bei einer Vaskulitis nach Kawasaki-Syndrom (Newburger *et al.*, 2016).

Trotz unterschiedlicher Ursachen sind die myokardialen Auswirkungen einer Ischämie mit Zelluntergang, Entwicklung einer Fibrose und konsekutiver Funktionseinschränkung sehr uniform. Daher kommt der Aufklärung pathophysiologischer Mechanismen kardialer Ischämie und Reperfusion eine breite klinische Bedeutung zu.

Neben den oben beschriebenen häufig durch den Lebensstil bedingten Risikofaktoren rücken dabei insbesondere im Hinblick auf Kinder und Jugendliche, bei denen viele dieser Faktoren für die Begünstigung eines ACS nicht infrage kommen, Prozesse auf zellulärer Ebene mehr und mehr in den Fokus der Wissenschaft. Beachtung gilt den Kanalopathien, die inzwischen für viele Erkrankungen verantwortlich gemacht werden konnten (Ashcroft, 2006). Bedeutende Beispiele für Erkrankungen des kardiovaskulären Systems sind das Long QT-Syndrom (LQTS, Keating *et al.*, 1991), das Short QT-Syndrom (SQTS, Gussak *et al.*, 2000; Gaita *et al.*, 2003) und das Brugada-Syndrom (Brugada *et al.*, 1992). Auch das Auftreten hereditärer Formen eines Vorhofflimmerns wird inzwischen mit der Mutation von Ionenkanälen in Zusammenhang gebracht (Riley *et al.*, 2012).

Panx1 ist ein Ionenkanal, dem aufgrund seiner elektrophysiologischen Eigenschaften und des weiten Expressionsmusters eine funktionelle Rolle innerhalb elementarer Prozesse wie Ischämie, Inflammation und Apoptose zugeschrieben wird (Shestopalov *et al.*, 2008). Nach derzeitigem Kenntnisstand wurde seine genaue Funktion bisher lediglich unter neurobiologischen Gesichtspunkten untersucht (u.a. Vogt *et al.*, 2005; Bargiotas *et al.*, 2011). Dabei zeigte sich, dass *Panx1*^{-/-}*Panx2*^{-/-}-Mäuse nach der Okklusion von Gehirnarterien kleinere Infarkte aufwiesen als Wildtypen (Bargiotas *et al.*, 2011).

Basierend auf diesen Ergebnissen wird nun die Rolle von Panx1 auch im Rahmen einer kardialen Ischämie und Reperfusion genauer analysiert. Zu diesem Zweck wurde bereits die kardiale Phänotypisierung der *Panx1*-defizienten Maus von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt (Petric *et al.*, 2016). Im vorliegenden Projekt soll *in vivo* am Mausmodell untersucht werden, in wie fern sich die Expression oder die Deletion von Panx1 im Herzen auf die myokardiale Schädigung

gung nach Koronarinfarkt auswirkt. Da der Ischämie- und Reperfusionsschaden nach Myokardinfarkt prognostische Relevanz besitzt, gilt eine mögliche pharmakologische Beeinflussung als therapeutische Basis. Sollte Panx1 eine modulierende Rolle im Rahmen von Ischämie- und Reperfusionseignissen spielen, wäre dies ein möglicher Ansatzpunkt therapeutischer Maßnahmen.

1.2 Kommunikation ist Alles:

Der Stoffaustausch zwischen den Zellen

Die Kommunikation zwischen Zellen und Zellverbänden spielt für die Entwicklung sowie die physiologischen und pathologischen Prozesse innerhalb der einzelnen Zellen eine entscheidende Rolle (Shestopalov *et al.*, 2008). Diese Kommunikation kann auf verschiedenen Wegen erfolgen: Lipophile (z. B. Steroide) und unpolare Moleküle können die Lipiddoppelschicht mittels Diffusion durchdringen und gleichen dadurch Konzentrationsunterschiede aus (Einfache Diffusion).

Für viele hydrophile und polare Moleküle oder geladene Ionen stellt die Zellmembran eine starke Barriere dar. Ein Konzentrationsausgleich durch einfache Diffusion ist hier nicht möglich. Sie benötigen Transporter (Wilkens 2015), Ionenkanäle (Catterall *et al.*, 2017) oder Zell-Zellverbindungen wie z.B. *Gap Junctions* (Epifantseva *et al.*, 2017), um die Zellmembran zu überwinden.

Transporter sind Substrat-spezifisch, folgen einer bestimmten Transportkinetik und benötigen Energie. Diese stammt entweder aus einem elektrochemischen Gradienten (passiver Transport) oder aus der Hydrolyse von ATP (Adenosintriphosphat; aktiver Transport). Ionenkanäle werden nach ihrer Öffnungsform (z.B. Spannungs- oder Liganden-gesteuert) charakterisiert und folgen keiner Enzym-ähnlichen Transportkinetik. Sie öffnen sich z.B. nach der Depolarisation der Membran und ermöglichen Ionenströme entlang ihres elektrochemischen Gradienten (z.B. Natrium (Na^+)- und Kalzium (Ca^{2+})-Einstrom in die Zelle, Catterall *et al.*, 2017).

Zell-Zellverbindungen (*Gap Junctions*) stellen Transportwege zwischen den Innenräumen aneinander grenzender Zellen dar (Berg *et al.*, 2013, S.397). Sie setzen sich aus zwei Semikanälen (Connexone) zusammen, von denen wiederum jeder aus sechs Untereinheiten (Connexinen) besteht (Berg *et al.*, 2013, S.397, Epifantseva *et al.*, 2017). Über die *Gap Junctions* wird ein bidirektio-

naler transmembranöser Transport von anorganischen Ionen und kleinen wasserlöslichen Molekülen ($\leq 1\text{kDa}$) ermöglicht, der Zellverbände zu metabolischen Synzytien macht, in denen funktionelle Abläufe synchronisiert werden können (Shestopalov *et al.*, 2008). So sind *Gap Junctions* bspw. für die Erregungsausbreitung im Herzmuskel, aber auch die Entwicklung und Differenzierung der Zellen essentiell.

1.3 Pannexine – kleine Poren von großer Bedeutung

1.3.1 Struktur der Pannexine

Pannexin-1 gehört neben Pannexin-2 und -3 zu einer Familie von drei Membranproteinen, die zwar strukturelle Ähnlichkeiten, aber nur geringe Sequenzhomologien zu den Connexinen aufweist. Ihre Bezeichnung leitet sich aus dem Griechischen *pan* = alles/ überall und dem Lateinischen *nexus* = Verbindung/ Bindung ab und weist auf ihr breites Verteilungsmuster (s.u.) und die Kanalfunktion hin. Pannexine kommen sowohl bei Vertebraten als auch bei Wirbellosen vor und stehen damit den Connexinen, die nur bei ersteren vorkommen, gegenüber (Panchin *et al.*, 2000). Analog zu den Connexinen besitzen sie vier Transmembrandomänen (TMD), die durch zwei extra- (zwischen TMD1 und TMD2) und eine intrazelluläre (zwischen TMD2 und TMD3) Schleife miteinander verbunden sind (**Abbildung 1**).

Darüber hinaus verfügen sie über je ein intrazellulär gelegenes carboxy- und aminoterminal Ende (Baranova *et al.*, 2004). Zu den Unterschieden zwischen den beiden Proteinfamilien gehört, dass Pannexine, genauso wie die Innexine der Invertebraten, nur zwei anstatt drei konservierte Cysteinreste an jeder extrazellulären Schleife besitzen (Barbe *et al.*, 2006). Diese Cysteinreste sind an der Regulation der Kanalfunktion beteiligt (Bunse *et al.*, 2011; Lohman *et al.*, 2012, s.u.).

Hinzu kommt eine N-Glykosylierung (Anbindung eines Zuckerrests an einen Asparaginrest), die sich an der ersten (Pann2 und Pann3) bzw. an der zweiten (Pann1) extrazellulären Schleife befindet (Penuela *et al.*, 2007; Penuela *et al.*, 2009). Diese verhindert vermutlich sterisch das Andocken benachbarter Pannexine aneinander (Boassa *et al.*, 2008; MacVicar *et al.*, 2010) und ist für die

Positionierung des Proteins in der Zelle und an der Zellmembran von Bedeutung (s.u., Boassa *et al.*, 2007).

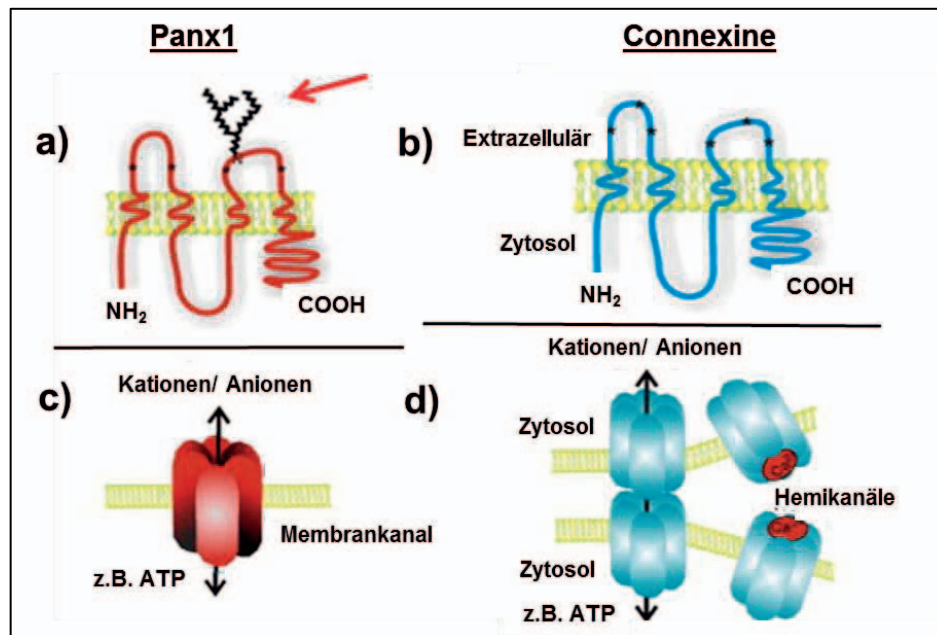


Abbildung 1: Mögliche Sekundärstruktur von Panx1 (a) mit zwei extrazellulären Cysteinresten (*) und Glykosylierung (roter Pfeil) im Vergleich zu der der Connexine (b) Panx1 fungiert vornehmlich als **c) Membrankanal**, während Connexine als **d) Hemikanäle** durch das Andocken aneinander *Gap Junctions* zwischen dem Zytoplasma benachbarter Zellen ausbilden (Modifiziert nach McVicar *et al.*, 2010).

In früheren Publikationen wurde den Pannexinen wie auch den Connexinen eine Funktion als sog. Hemikanäle, die zur Ausbildung von *Gap Junctions* in der Zellmembran dienen, zugeschrieben. Sie sind definiert als große, nichtselektive Ionenkanäle in der nicht-junktionalen Plasmamembran, bevor sie *Gap Junctions* ausbilden (Ebihara, 2003). Diese Annahme basierte vor allem auf Versuchen mit *Xenopus*-Oozyten, bei denen die Ausbildung dieser interzellulären Verbindungen beobachtet worden war (Bruzzone *et al.*, 2003). Sosinsky *et al.* fassten 2011 zusammen, weshalb diese Nomenklatur oftmals irreführend ist (Sosinsky *et al.*, 2011). Als Beleg führten sie u.a. an, dass die Paarung von Oozyten nur unter Bedingungen sehr langer Paarungszeiten möglich ist (Bruzzone *et al.*, 2003; Boassa *et al.*, 2007). Dies ist bisher nur experimentell gelungen, wodurch die Frage nach der Bildung von *Gap Junctions* durch Panx1 *in vivo* nach wie vor diskutiert wird (Locovei *et al.*, 2006b). Des Weiteren zeigte die Arbeitsgruppe um Gina Sosinsky mittels Immunfluoreszenz, dass sich Panx1 und Panx3 an polarisierten Zellen wie z. B. dem Atemwegsepithel insbesondere apikal konzentrieren, also dort, wo sich keine Nachbarzellen befinden. Konträr dazu

kommen *Gap Junctions* eher an der basolateralen Membran derartiger Zellen vor. Aufgrund dieser und weiterer Unterschiede erscheint die Bezeichnung als „Membrankanäle“ korrekter. Pannexine sind demnach die Lipiddoppelschicht überspannende Kanäle, die einen Austausch zwischen dem Cytoplasma und dem extrazellulären Raum (EZR) ermöglichen.

Entgegen dieser Argumentation zeigten Sahu *et al.* kürzlich, dass sowohl Panx1 als auch Panx3 sehr wohl *Gap Junctions* ausbilden. Dieses Verhalten ist demnach zellspezifisch und nur bei einer Hypoglykosylierung möglich. Eine stärkere Glykosylierung verhindert, wie bereits oben beschrieben, das Andocken benachbarter Pannexine aneinander (Sahu *et al.*, 2014). Auch im Zusammenhang mit der interzellulären Ca^{2+} -Ausbreitung wurde bereits auf eine Gap-Junction-Funktion des Panx1 hingewiesen, jedoch unter Bedingungen einer Überexpression des Proteins (Vanden Abeele *et al.*, 2006).

Alle drei Pannexin-Varianten erfahren im Anschluss an die Translation diese unterschiedlich starke Glykosylierung (Boassa *et al.*, 2007) und können danach sowohl intrazellulär als auch in der Zellmembran vorkommen (Penuela *et al.*, 2009). Der Grad der Glykosylierung und die Lokalisation in der Zelle sind dabei offensichtlich für den zielgerichteten Transport der Pannexine an die Zelloberfläche von Bedeutung. Eine Verhinderung der Glykosylierung führt zu einer ausschließlich intrazellulären Lokalisation von Panx1 (Boassa *et al.*, 2007). Penuela *et al.*, bestätigten dies in einer Publikation von 2009 und beschrieben darüber hinaus, dass der Glykosylierungsgrad auch für die Interaktion der Pannexine untereinander eine Rolle spielt. Weiterhin postulierten sie, dass die verschiedenen Pannexin-Varianten bei Koexpression die gegenseitige Funktion beeinflussen können (Penuela *et al.*, 2009).

1.3.2 Genexpression

Die Sequenzen der Pannexine von Mensch und Maus sind stark konserviert. Auf Proteinebene sind sie zu 93% (Panx2 und Panx3) bzw. 94% (Panx1) identisch (Penuela *et al.*, 2009). Innerhalb der Proteinfamilie besteht eine größere Ähnlichkeit zwischen Panx1 und Panx3: Die kodierenden Gene sind bei beiden Spezies auf dem gleichen Chromosom lokalisiert und es wird vermutet, dass sie ursprünglich durch eine chromosomale Duplikation entstanden sind (Baranova *et al.*, 2004). Auch das Verteilungsmuster untermauert diese Annahme: Panx1

wird ubiquitär exprimiert und Panx3 kommt in verschiedenen embryonalen Geweben und beim Erwachsenen im Knochen, der Haut und dem Knorpelgewebe vor, wohingegen Panx2 nur im ZNS exprimiert wird (Baranova *et al.*, 2004). Außerdem wurde eine Koexpression von Panx1 und Panx3 in verschiedenen Geweben und Zelltypen nachgewiesen (Penuela *et al.*, 2007; Penuela *et al.*, 2008).

Bisher am besten erforscht ist Panx1. Das kodierende Gen ist beim Menschen auf dem Chromosom 11q14.3 lokalisiert. Es besitzt fünf Exons, wovon das fünfte in zwei Varianten gespleißt wird. Hierdurch entstehen zwei Panx1-Subtypen: Panx1a und Panx1b, wovon Panx1a mit 426 Aminosäuren (AS) einen um 4 AS kürzeren C-Terminus (Carboxy-Terminus) aufweist als Panx1b (430 AS) (Baranova *et al.*, 2004).

Offensichtlich wird die Pannexin-Expression dynamisch durch physiologische und pathophysiologische Prozesse reguliert. So kommt Panx2 in intakten Astrozyten normalerweise nicht vor, die Expression kann aber durch Ischämie und Reperfusion induziert werden (Zappalà *et al.*, 2007).

1.3.3 Aktivierung und Funktionen von Panx1

Von den drei Pannexin-Spezies ist die Funktion von Panx1 bisher am besten erforscht. Das Protein bildet einen aus sechs Monomeren bestehenden Kanal (Boassa *et al.*, 2007; Ambrosi *et al.*, 2010). Je nach Gewebe ist auch die Ausbildung heteromultimerer Kanäle (Panx1/Panx2) möglich (Bruzzone *et al.*, 2003).

Alle Kanalformen haben gleiche pharmakologische Eigenschaften (Bruzzone *et al.*, 2005): Sie zeichnen sich durch eine hohe Leitfähigkeit (500pS) und geringe Selektivität aus und sind dadurch für viele Ionen und Moleküle (< 1kDa), allen voran ATP (Bao *et al.*, 2004), aber auch Farbstoffe (Pelegri *et al.*, 2006), die experimentell eine große Rolle spielen, durchlässig. Dadurch sind sie insbesondere für parakrine Signalwege von Bedeutung (D'hondt *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu den Connexin-Hemikanälen wird die Öffnung von Panx1 nicht durch physiologische extrazelluläre Ionenkonzentrationen reguliert (MacVicar *et al.*, 2010; Shestopalov *et al.*, 2008). Vielmehr führen mechanischer Stress (Bao *et al.*, 2004), ein Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration (Locovei *et al.*, 2006a), eine Depolarisation der Membran auf

über -20mV (Bruzzone *et al.*, 2005) und die Aktivierung durch ATP über purinerge Rezeptoren (Locovei *et al.*, 2007) zu einer Öffnung von Panx1.

Der genaue Mechanismus hinter der Panx1-Aktivierung wurde zuletzt 2012 von Sandilos *et al.* beleuchtet. Ausgehend von der Beobachtung, dass eine Caspase-Spaltstelle im C-Terminus von Panx1 für die Aktivierung von Bedeutung ist (Chekeni *et al.*, 2011), wurde dieser Bereich des Proteins mittels trunkierter Panx1-Konstrukte genauer untersucht. Sie stellten fest, dass der C-Terminus als Kanalblocker wirkt und erst seine Dissoziation von der Kanalpore zu einer durch Caspase-Spaltung vermittelten Öffnung führt (Sandilos *et al.*, 2012). Im gleichen Jahr konnte auch in Kardiomyozyten eine Caspase-abhängige Panx1-Aktivierung nachgewiesen werden (Dolmatova *et al.*, 2012).

Panx1 sind in der Vergangenheit aufgrund seiner elektrophysiologischen Eigenschaften und des weiten Expressionsmusters vielerlei Funktionen zugeschrieben worden. Insbesondere die Permeabilität für das extrazellulär weit verbreitete Nukleotid ATP (Locovei *et al.*, 2006b), das als Signalmolekül im Rahmen verschiedenster Signaltransduktionswege von essentieller Relevanz ist, untermauert seine Bedeutung. Inzwischen ist sogar davon auszugehen, dass Panx1 das dominante Protein für die Kanal-vermittelte ATP-Freisetzung darstellt (Dahl *et al.*, 2012). Die anschließende Wirkung von ATP wird über purinerge Rezeptoren vermittelt, die ligandengesteuert oder G-Protein-gekoppelt sein können.

So kann Panx1 auf der einen Seite durch extrazelluläres ATP über die Aktivierung eines purinergen Rezeptors geöffnet werden (Locovei *et al.*, 2007; Dahl *et al.*, 2012) oder direkt, als Antwort auf eine Öffnung anderen Ursprungs (s.o.), ATP freisetzen (z.B. Bao *et al.*, 2004; Locovei *et al.*, 2006a; Bruzzone *et al.*, 2005).

1.3.3.1 Funktion im Rahmen der Kalziumausbreitung

Die Ausbreitung von Kalziumionen über mehrere Zellen hinweg kann über *Gap Junctions* oder Rezeptor-vermittelt über Ionenkanäle erfolgen. Panx1 erfüllt die notwendigen Kriterien für einen solchen Kanal, weshalb ihm in diesem Zusammenhang eine primäre Funktion zugeschrieben wird. Der Membrankanal wird bspw. durch mechanischen Stress geöffnet und ATP gelangt in den EZR (**Abbildung 2**). Von dort aus aktiviert es G-Protein-gekoppelte purinerge P2Y-

Rezeptoren, woraus die Stimulation einer Phospholipase C resultiert. Durch die anschließende Produktion von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) wird die vermehrte Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern in das Zytoplasma und die Aktivierung von *Gap Junctions* vermittelt. Über diese gelangt das Ca^{2+} in benachbarte Zellen. Zusätzlich aktiviert eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle weitere Panx1-Kanäle, wodurch eine so hohe extrazelluläre ATP-Konzentration entsteht, dass dieses auch zu weiter entfernten Zellen diffundieren und so die Ausbreitung der Ca^{2+} -Welle vorantreiben kann (Locovei *et al.*, 2006a). Auch innerhalb einer einzelnen Zelle trägt Panx1 zur Ca^{2+} -Homöostase bei, als sog. intrazellulärer *Calcium Leak Channel* im endoplasmatischen Retikulum. So werden hier durch einen Ausstrom von Ca^{2+} über diese „Leaks“ in das Zytoplasma und einen aktiven Rücktransport über ATP-abhängige Ca^{2+} -Pumpen viele physiologische Prozesse reguliert (Vanden Abeele *et al.*, 2006).

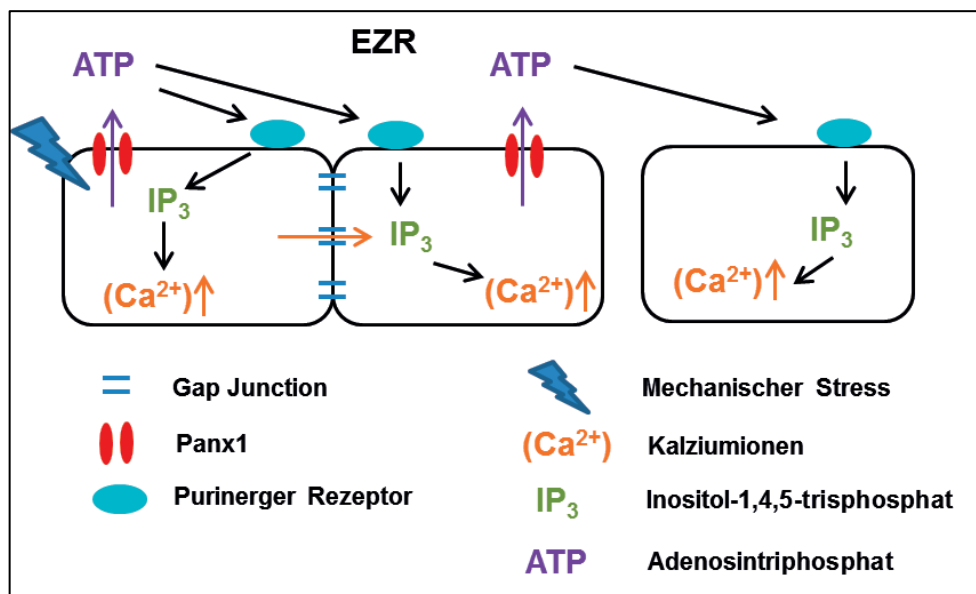


Abbildung 2: Mögliche Rolle von Panx1 im Rahmen der Initiierung und Weiterleitung einer Ca^{2+} -Welle. Panx1 wird durch mechanischen Stress geöffnet und ATP gelangt in den EZR. Dort aktiviert es purinerge Rezeptoren, woraus die Stimulation einer Phospholipase C und die Produktion von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) resultieren. IP_3 vermittelt die vermehrte Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern in das Zytoplasma und die Aktivierung von *Gap Junctions*. Über diese gelangt das Ca^{2+} in benachbarte Zellen. Zusätzlich aktiviert eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle weitere Panx1-Kanäle, wodurch eine so hohe extrazelluläre ATP-Konzentration entsteht, dass dieses auch zu weiter entfernten Zellen diffundieren und so die Ausbreitung der Ca^{2+} -Welle vorantreiben kann (Modifiziert nach Locovei *et al.*, 2006a).

1.3.3.2 Funktion im Rahmen von Inflammation und Apoptose

Die Tatsache, dass Panx1 eine Permeabilität für Ca^{2+} besitzt und an der Steuerung des zellulären Ca^{2+} -Haushalts beteiligt ist, rückt das Protein auch im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen in den Fokus. Kalzium als „Signal des Lebens und des Todes“ kontrolliert nicht nur die Entwicklung, Differenzierung und Funktion der Zellen, sondern hat auch Einfluss auf den Zelltod (Berridge *et al.*, 1998). Hohe und lang anhaltende zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentrationen sind toxisch und können zu Abbauprozessen im Rahmen von Apoptose und Nekrose führen. So kommt es zur Aktivierung von Nukleasen, die die DNA spalten und das Chromatin abbauen (Nicotera *et al.*, 1994).

Die purinergen Rezeptoren P2X7 und P2Y können eine Aktivierung von Panx1 initiieren (Locovei *et al.*, 2006a, 2007). Der P2X7-Rezeptor, der auf Makrophagen und anderen Immunzellen exprimiert und durch hohe extrazelluläre ATP-Konzentrationen geöffnet wird (Pelegriin *et al.* Suprenant, 2006), führt bei prolongierter Applikation von ATP zur Formierung einer großen Pore und zum Zelltod (Locovei *et al.*, 2007). Das freigesetzte ATP mediert über die Inflammasom-Aktivierung und Spaltung der Pro-Caspase-1 in die aktive Form die Freisetzung von Interleukin-1 β (Il-1 β), das als Initiator der akuten Entzündungsantwort betrachtet wird (Dinarello, 2005).

Pelegriin und Suprenant zeigten 2006 die Koexpression von Panx1 und P2X7 und wiesen nach, dass Panx1 sowohl für die Caspase-1-Spaltung als auch für die Freisetzung von Il-1 β benötigt wird. Diese Verbindung und Aktivierung der P2X7-Panx1-Kopplung kann durch einen Abfall der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, wie sie im Rahmen vieler pathophysiologischer Prozesse vorkommt, getriggert werden (Poornima *et al.*, 2012). Damit kommt Panx1 eine Schlüsselrolle in der P2X7-vermittelten Inflammasom-Aktivierung zu (Pelegriin *et al.* Suprenant, 2006), insbesondere, da der Kanal auch durch die Freisetzung von Nukleotiden als „Find-me“-Signale zur Monozyten-Rekrutierung beiträgt (Chekeni *et al.*, 2010) und darüber hinaus ein positives Feedback-Signal (ATP-induzierte ATP-Freisetzung) auslöst (Dahl *et al.* Keane, 2012). Nicht zuletzt untermauert eine pharmakologische Panx1-Blockade durch die gleichen Verbindungen, die auch die Inflammasom-Aktivität beeinflussen (Qiu *et al.*, 2011; Lamkanfi *et al.*, 2009), die Bedeutung des Proteins für die Entzündungsantwort.

Panx1 kann nicht nur durch ATP aktiviert werden, weshalb es weiterhin mit dem sekundären Zelltod in Verbindung gebracht wird. Primär geschädigte Zellen setzen zahlreiche Komponenten wie bspw. Kaliumionen (K^+ ; Silverman *et al.*, 2009) und Glutamat (Thompson *et al.*, 2008) frei. Diese stimulieren Panx1 so stark, dass der Regulationsmechanismus (**vgl. Kapitel 1.3.3.5**) versagt. Als Folge kommt es zum Absterben ursprünglich nicht geschädigter Zellen.

1.3.3.3 Funktion im Gehirn

Neben Panx2 wird auch Panx1 in verschiedenen Teilen des Gehirns wie bspw. dem *Hippocampus*, dem *Bulbus olfactorius*, dem *Cortex* und dem *Cerebellum* exprimiert (Bruzzone *et al.*, 2003). Darüber hinaus konnte eine Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen werden (Bruzzone *et al.*, 2005).

Der Einfluss der Pannexine auf einen Hirninfarkt wurde 2011 von Bargiotas *et al.* genauer untersucht: Eine Okklusion der *A. cerebri media* (Mittlere Gehirnschlagader) führte in *Panx1^{-/-}Panx2^{-/-}*-Mäusen zu signifikant kleineren Infarkten und einem geringer ausgeprägten neurologischen Folgeschaden (evaluiert mittels des Corner-Tests und der Bewegungsklatenz) im Vergleich zu *Panx1^{+/-}*-Tieren (Bargiotas *et al.*, 2011).

1.3.3.4 Funktion im kardiovaskulären System

Panx1 wird eine wichtige Rolle im Rahmen der Blutdruckregulation zugeschrieben. Die Beobachtung, dass Erythrozyten trotz fehlender *Gap-Junction-Kanäle* bei niedriger O_2 -Spannung (Sauerstoff-Spannung) oder unter mechanischem Stress ATP freisetzen, führte zu der Hypothese, dass Panx1 als Mediator involviert ist. Tatsächlich wird das Protein in den roten Blutkörperchen exprimiert und vermittelt hier via ATP-Freisetzung eine Vasodilatation, d.h. die Erythrozyten setzen das Nukleotid als Antwort auf eine verminderte Sauerstoffversorgung des Blutes frei (**Abbildung 3**). Dieses bindet an purinerge Rezeptoren der Endothelzellen und an die roten Blutzellen selbst. An letzteren bewirkt es, ähnlich wie im Rahmen der Entzündungsantwort (**vgl. Kapitel 1.3.3.2**), eine ATP-induzierte ATP-Freisetzung und triggert so das ATP-Signal. Am Gefäßendothel führt dies zur Initiierung einer Ca^{2+} -Welle und darüber zur Freisetzung von

Stickstoffmonoxid (NO). Dieses diffundiert in die benachbarten glatten Muskelzellen und verursacht dort eine Relaxation mit anschließender Vasodilatation, was eine bessere Sauerstoffversorgung bewirkt (Locovei *et al.*, 2006b).

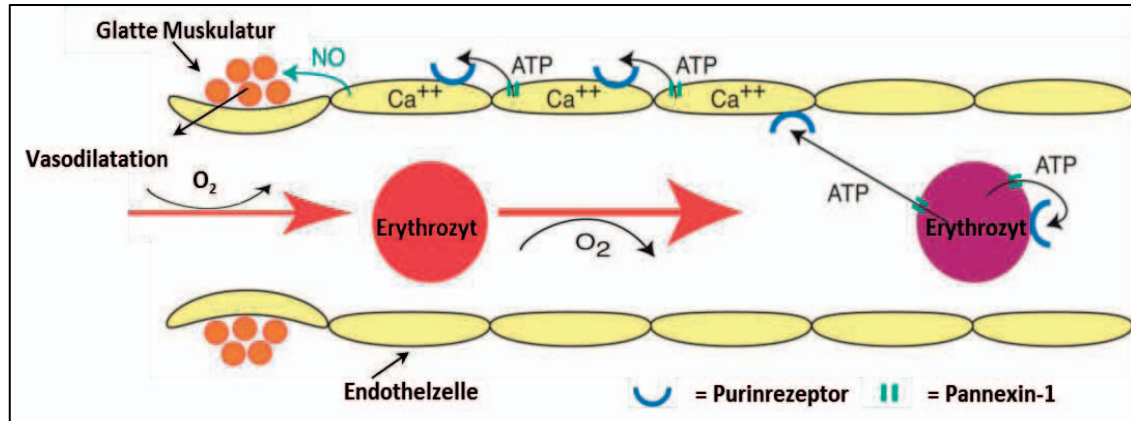


Abbildung 3: Panx1-vermittelte ATP-Freisetzung aus Erythrozyten und dadurch initiierte Vasodilatation. Erythrozyten setzen als Antwort auf eine verminderte Sauerstoffversorgung des Blutes über Panx1 ATP frei. Dieses bindet an purinerge Rezeptoren der Endothelzellen und an die Erythrozyten selbst. An letzteren bewirkt es eine ATP-induzierte ATP-Freisetzung und triggert so das ATP-Signal. Am Gefäßendothel führt dies zur Initiierung einer Ca²⁺-Welle und darüber zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO). Das NO diffundiert in die benachbarten glatten Muskelzellen und verursacht dort eine Relaxation mit anschließender Vasodilatation, wodurch die Sauerstoffversorgung verbessert wird (Modifiziert nach Locovei *et al.*, 2006b).

Weiterhin zeigten Billaud *et al.* 2011, dass Panx1 in Arteriolen exprimiert wird. Diese sind über α 1D-adrenerge Rezeptoren maßgeblich an der Vasokonstriktion und damit an der Blutdruckregulation beteiligt. Ko-Immunpräzipitationen wiesen eine Kollokalisierung von Panx1 mit dem Adrenozeptor nach. Eine pharmakologische Blockade von Panx1 resultierte schließlich in einer signifikant verminderten Kontraktion nach Stimulation der Widerstandsgefäße mit Phenylephrin (Billaud *et al.*, 2011). Diese Beobachtungen stützen die Annahme, dass Panx1 im Rahmen der systemischen Blutdruckregulation eine wichtige wenn auch je nach Lokalisation sehr unterschiedliche Rolle zukommt.

Im Herzen wird Panx1 in den Vorhöfen und in den Ventrikeln von C57/Bl6-Mäusen exprimiert (Petric *et al.*, 2016). Die Beobachtung, dass das Protein in isolierten Kardiomyozyten als *Large Conductance Channel* ein Ca²⁺-unabhängiges Aktionspotential (AP) auslösen kann, führte zu der Hypothese, dass Panx1 Einfluss auf die Entstehung von Arrhythmien haben könnte (Kienitz *et al.*, 2011).

Nishida *et al.* zeigten 2008, dass Panx1 in die Ausbildung einer kardialen Fibrose involviert ist. In einem Mausmodell wurde mittels transaortaler Konstriktion

eine Druckbelastung des Herzens ausgelöst, wodurch Gα12/13-Proteine als Teil des Rho-Signalwegs die Transkription fibrogenetischer Gene (TGF-β, Periostin, Prokollagen Typ I und III) induzieren. Gα12/13-Proteine interagieren mit dem purinergen Rezeptor P2Y6, der durch ATP-Bindung aktiviert wird. Das hierfür notwendige ATP stammt aus Pannexin-Kanälen, wie mittels Carbenoxolon-(CBX)-Blockade gezeigt werden konnte (Nishida *et al.*, 2008).

Die Rolle von Panx1 im Rahmen der kardialen Fibrose wurde 2012 durch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Elena Dolmatova bekräftigt: Unter zellulärem Stress, hier induziert durch Sauerstoffentzug, setzen Kardiomyozyten über Panx1 vermehrt ATP frei und der Transfer des glykosylierten Panx1 in die Zellmembran wird forciert. ATP aktiviert die Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Ausgehend von diesen Ergebnissen ist denkbar, dass Panx1 in einem frühen Stadium nach kardialer Ischämie ein parakrines Signal liefert, das die Fibroblastenaktivierung initiiert (Dolmatova *et al.*, 2012). Fibrotisch umgebautes Myokard führt erneut auf eine Rolle des Panx1 im Zusammenhang mit Arrhythmien zurück, denn diese strukturellen Veränderungen sowie eine veränderte Ionenkanal-Expression tragen als wesentlicher pathogenetischer Faktor zur Genese von Herzrhythmusstörungen bei (de Bakker *et van Rijen*, 2007).

Indes gibt es erste Hinweise von *In-vitro*-Studien, die auf eine kardioprotektive Wirkung von Panx1 hinweisen: Eine ischämische Prä- bzw. Postkonditionierung über ATP-Freisetzung führt aus einem Panx1/P2X7-Komplex zur Freisetzung multipler kardioprotektiver Substanzen. Dies wurde in einem *Ex-vivo*-Rattenmodell am Langendorff-perfundierten Herzen anhand resultierender kleinerer Herzinfarkte evaluiert. Der schützende Effekt wird durch eine weitere Kanalöffnung innerhalb eines kurzen Zeitfensters während der Reperfusion nach Ischämie noch verstärkt (Vessey *et al.*, 2011).

Dieser, zur Rolle von Pannexin im Rahmen der Inflammation und Apoptose eher widersprüchliche Effekt, erklärt sich wahrscheinlich aus der sehr kurzen Öffnungszeit der Kanäle im Falle einer ischämischen Prä- und Postkonditionierung (Vessey *et al.*, 2010).

1.3.3.5 Regulation von Panx1

Aufgrund der hohen Leitfähigkeit und geringen Selektivität von Panx1 können verlängerte oder wiederholte Aktivierungen durch einen Verlust des Ionengradienten und wichtiger intrazellulärer Moleküle zum Zelltod führen (Qiu *et al.*, 2009; Locovei *et al.*, 2007). Qiu *et al.* bezeichneten Panx1 in einer Publikation von 2009 deshalb als „potentiell tödlichen Kanal“ (Qiu *et al.*, 2009).

Umso wichtiger erscheinen vor diesem Hintergrund die Regulationsmechanismen, die eine unkontrollierte Öffnung von Panx1 verhindern. Eine Schlüsselrolle kommt hierbei der Funktion des intrazellulären C-Terminus als Kanalblocker zu (**vgl. Kapitel 1.3.3**). Dafür sprechen auch die Ergebnisse einer Studie von 2005, in der erstmals nachgewiesen wurde, dass Panx1 durch Interaktion seines C-terminalen Endes mit einem weiteren Protein reguliert werden kann (Bunse *et al.*, 2005). Wie genau diese Blockade auf molekularer Ebene vonstattengeht, wird für zukünftige Untersuchungen von großem Interesse sein (Bunse *et al.*, 2011), da dies die Möglichkeit eröffnet, Verbindungen zu entwickeln, die Panx1 aktivieren oder blockieren (Sandilos *et al.*, 2012).

Ebenso sind die Cystein-Reste an den extrazellulären Schleifen der Proteine (**vgl. Kapitel 1.3.1**) sowie das transmembranöse Cystein 40 (Cys-40; Bunse *et al.*, 2011) und das intrazelluläre Cystein 346 (Cys-346; Bunse *et al.*, 2010) an der Panx1-Regulation beteiligt. So kann durch eine S-Nitrosylierung von Cys-40 und Cys-346 der Kanal blockiert und die chronische ATP-Freisetzung gestoppt werden (Lohman *et al.*, 2012). Neben der Kanal-internen Blockade sichern weiterhin äußere Faktoren wie die spannungsabhängige Öffnung die Funktionsfähigkeit der Zelle (Bao *et al.*, 2004).

Auch ATP als eigentlicher Aktivator kann nach der Öffnung des Kanals durch einen negativen Feedback-Mechanismus zur Kanalschließung führen (Qiu *et al.*, 2009).

Nicht zuletzt ist experimentell eine pharmakologische Blockade für die Regulation von Panx1 von Bedeutung. Carbenoxolon (CBX), ein synthetisches Derivat der Glycyrrhetinsäure, ist ein potenter Blocker von Panx1 und inhibiert den Kanal konzentrationsabhängig und reversibel (Bruzzzone *et al.*, 2005). Es wurde daher in der Vergangenheit in vielen Studien zur Kanalblockade verwendet (u.a. Locovei *et al.*, 2006b und 2007; Sandilos *et al.*, 2012). CBX blockiert jedoch auch Connexin-Kanäle (Goldberg *et al.*, 1995) weshalb inzwischen Probenecid

mehr und mehr in den Vordergrund rückt. Probenecid ist bekannt als Inhibitor der organischen Anionentransporter 1 und 3 (Hagos *et al.*, 2017) und wird klinisch zur Therapie einer chronischen Gichterkrankung eingesetzt (Pui *et al.*, 2013). Es ist ein potenter Blocker von Panx1 und hat im Gegensatz zu CBX keinen Einfluss auf Connexine (Silverman *et al.*, 2008).

1.4 Die genetisch modifizierte Maus als Versuchsobjekt

Als genetisch modifiziert werden Tiere bezeichnet, bei denen gezielt in das Erbmateriale eingegriffen wurde. Dies kann auf verschiedenen Wegen (s.u.) geschehen. Das Ziel dieser Methoden besteht darin, dass durch das Einfügen, Ausschalten, Entfernen oder Modifizieren eines Gens und die Analyse der dadurch auftretenden Veränderungen im Organismus Rückschlüsse auf dessen Funktion in der Zelle bzw. im Organismus gewonnen werden können.

Was in der zweiten Hälfte des vorigen Jahrhunderts zunächst an Prokaryonten und eukaryontischen Zellkulturen gelungen war, wurde schon bald auch auf größere Organismen ausgeweitet (Schenkel, 2006, S.1). Die ersten transgenen Mäuse entstanden 1974 in den Laboratorien von Brinster (Brinster, 1974). Einen weiteren Meilenstein dieses Forschungszweigs stellte die 1982 erstmals gelungene Integration eines Wachstumshormon-Gens aus der Ratte in die Keimbahn der Maus dar. Das Resultat waren deutlich größere Nachkommen. Dieser Erfolg trug maßgeblich zum Verständnis des Einbringens von Fremdgenen in Säugetiere bei (Palmiter *et al.*, 1982).

Heute spielt das transgene Mausmodell vor allem in der Grundlagenforschung eine bedeutende Rolle. Die Maus als Versuchstier vereint gleich mehrere Vorteile: Zunächst ähnelt das Mäusegenom sehr stark dem des Menschen und ist daher für die Erforschung genetisch bedingter Krankheiten sehr gut geeignet (Ahne, 2007, S.35). Hinzu kommen ein kurzer Reproduktionszyklus, einfache Handhabung und niedrige Kosten für die Haltung. Auch die genetische Manipulation und die Möglichkeit, eine ausreichende Anzahl von Tieren innerhalb eines realistischen Zeitraums zu untersuchen, bieten viele Vorteile (Stöckigt *et al.*, 2014).

An dieser Stelle sei allerdings stets auch die Kehrseite der Medaille zu betrachten: Die Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch die Haltung vor und während der Versuche und durch zirkadiane Rhythmen, die Frage nach der Über-

tragbarkeit der Ergebnisse, insbesondere bei Krankheitsmodellen, und die hohe Ausschlussrate von Tieren, die nicht für den entsprechenden Versuch geeignet sind, seien hier nur beispielhaft zu erwähnen. Diese und weitere Gründe rücken Tierversuche auch zu Forschungszwecken immer wieder in ein „Spannungsfeld von Praxis und Bioethik“ (Ahne, Buchtitel, 2007).

Die ethische Vertretbarkeit des vorliegenden Versuchsvorhabens wurde im Vorhinein sorgfältig abgewogen und im Tierversuchsantrag detailliert beschrieben. Das vorliegende Projekt baut auf dem bereits abgeschlossenen Projekt zur kardialen Phänotypisierung der *Panx1*-defizienten Maus auf. Mit der *Panx1*^{-/-}-Maus kann nun im zweiten Schritt die Beeinflussung der myokardialen Schädigung nach kardialer Ischämie und Reperfusion durch Panx1 genauer charakterisiert werden. Damit ist es erstmals möglich, ohne Verwendung pharmakologischer Inhibitoren und im *In-vivo*-Modell die Funktion von Panx1 weiter aufzuklären. Aufgrund der Vergleichbarkeit physiologischer Prozesse in der Maus mit denen im Menschen (**vgl. Kapitel 4.3.2**) und der starken Sequenzhomologie zwischen humanem und murinem Panx1 (**vgl. Kapitel 4.7**) ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse weitestgehend transferiert werden können, um so zukünftig mögliche Therapieansätze im Rahmen eines Infarktgeschehens zu entwickeln.

1.4.1 Die Generierung transgener Mäuse

Grundsätzlich unterscheidet man bei der Generierung transgener Tiere zwei Methoden: Bei der Vorkerninjektion (**Abbildung 4**) wird das zusätzliche Gen zufällig in das Genom des Individuums integriert. Hierzu wird zunächst durch das Herbeiführen einer Superovulation bei geeigneten „Spenderweibchen“ eine große Zahl ovulierter Oozyten gewonnen, die dann nach der Verpaarung aus dem Ovidukt entnommen werden. Unter dem Mikroskop wird anschließend die zuvor molekularbiologisch aufbereitete Fremd-DNA als transgenes Konstrukt in den männlichen Vorkern der befruchteten Eizelle injiziert. Sind die Embryonen nach der Mikroinjektion noch intakt, werden sie schließlich in die Eileiter scheinträchtiger sog. „Ammenweibchen“ transferiert und ausgetragen. Wurde das DNA-Konstrukt in das Genom des Nachkommen integriert, trägt dieser das Gen in allen Körperzellen und vererbt es dementsprechend auch an die nächste Generation. Man bezeichnet solche Tiere als *Founder*, mit denen man eine eigene

mutante Linie (*Transgenic Founder Line*) begründen kann (Schenkel, 2006, S.39f.). Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass das Genom nicht gezielt verändert werden kann. Darüber hinaus gelingt die stabile Integration der zugeführten DNA nur in ca. 30% der Fälle (Henning *et* Graw, 2010, S.453).

Die zweite Methode stellt die Veränderung des Erbmaterials mittels homologer Rekombination dar (**Abbildung 4**). Sie wird auch als *Gene Targeting* bezeichnet, da hierbei ein bekanntes Gen zielgerichtet mutiert (*Knock-in-Tiere*) oder ausgeschaltet (*Knock-out-Tiere*) werden kann. Zu diesem Zweck gewinnt und kultiviert man zunächst embryonale Stammzellen (ES) aus frühen Embryonen. Diese werden anschließend mit Hilfe eines Targeting-Vektors transfiziert. Der Vektor enthält das mutierte Allel und flankierende genomische Sequenzen, so dass im Anschluss die Integration in das Erbgut mittels homologer Rekombination möglich ist. Diese tritt jedoch nur sehr selten auf (Wahrscheinlichkeit 10^{-6} bis 10^{-9} ; Henning *et* Graw, 2010, S. 445) und die wenigen Zellen müssen mittels Selektionsmarker aussortiert, angereichert und in die Blastozysten einer anderen Linie injiziert werden. Anschließend werden die frühen Embryonen in den Uterus scheinträchtiger Ammenweibchen übertragen. Die Nachkommen bezeichnet man als Chimäre, da sie die genetischen Veränderungen in einem Teil ihrer Zellen tragen. Sind davon auch Keimzellen eines Tieres betroffen (Keimbahnchimäres Tier), kann man durch die Verpaarung dieses Tieres mit einem Wildtypen Nachkommen erzeugen, bei denen alle Körperzellen das veränderte Gen tragen, und so die Zucht einer mutierten Linie aufbauen (Schenkel, 2006, S.41ff.).

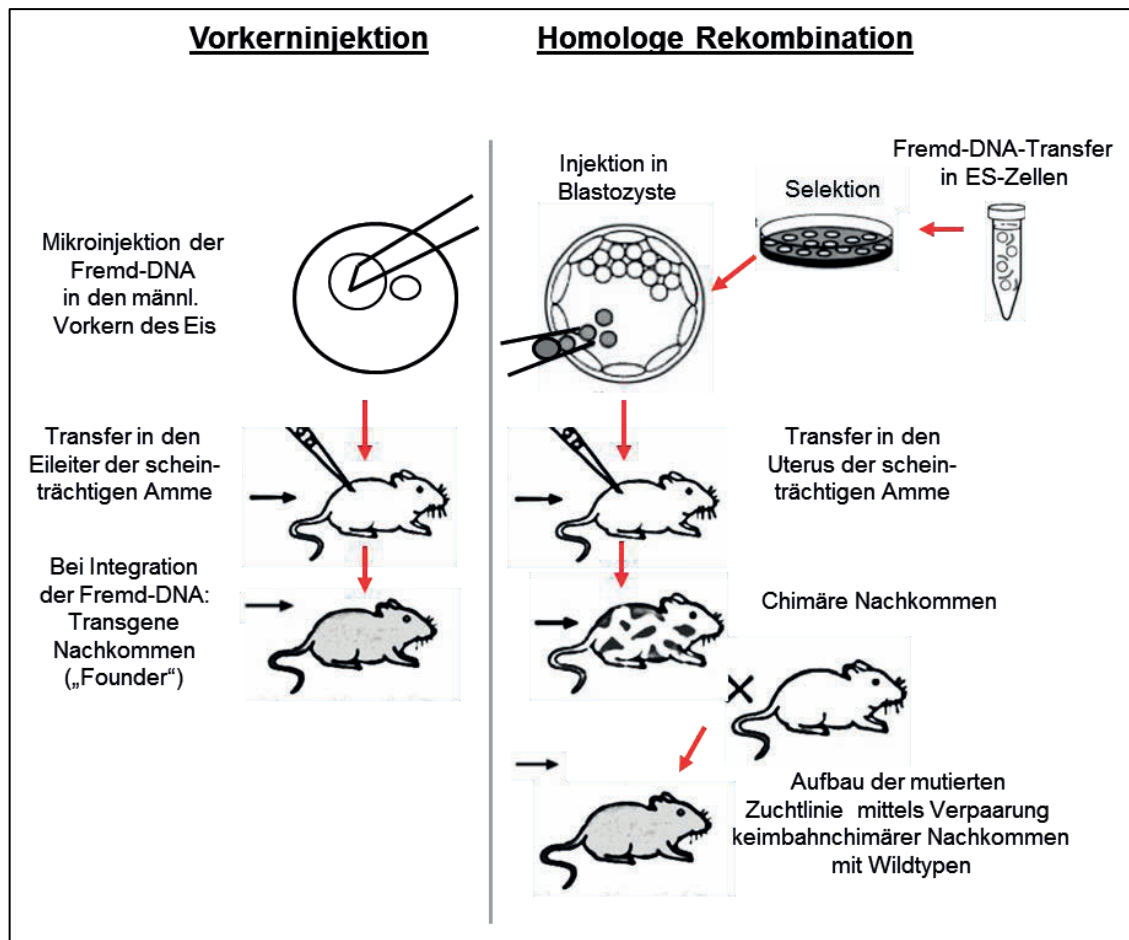


Abbildung 4: Herstellung transgener Mäuse. Bei der Vorkerninjektion wird die zuvor molekularbiologisch aufbereitete Fremd-DNA in den männlichen Vorkern injiziert. Die intakten Embryonen werden in die Eileiter scheinträchtiger Ammen (weiße Maus) transferiert und ausgetragen. Bei Integration der Fremd-DNA entstehen sog. *Founder* (graue Maus). Bei der Homologen Rekombination werden ES mit Hilfe eines Targeting-Vektors transfiziert und in die Blastozysten einer anderen Linie injiziert. Anschließend werden die frühen Embryonen in den Uterus scheinträchtiger Ammen (weiße Maus) übertragen. Die Nachkommen bezeichnet man als Chimäre (gefleckte Maus), da sie die genetischen Veränderungen in einem Teil ihrer Zellen tragen. Sind davon auch Keimzellen eines Tieres betroffen (Keimbahnchimäres Tier), kann man durch die Verpaarung mit einem Wildtyp (weiße Maus) Nachkommen erzeugen, bei denen alle Körperzellen das veränderte Gen tragen (graue Maus), und so die Zucht einer mutierten Linie aufbauen (Modifiziert nach einer Darstellung aus: Lexikon der Neurowissenschaft, transgene Mäuse).

1.5 Ziel der Arbeit

Panx1 ist ein im menschlichen und tierischen Organismus ubiquitär exprimierter Ionenkanal, dem eine Funktion im Rahmen von Ischämie, Inflammation und Apoptose zugeschrieben wird. Zur weiteren Untersuchung dieses Ionenkanals wurde in den vergangenen Jahren in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Hannah Monyer, Ärztliche Direktorin der Abteilung für Klinische Neurobiologie am Universitätsklinikum Heidelberg, ein Knockout-Mausmodell etabliert. Die Untersuchung *Panx1*-defizienter Mäuse wurde bisher jedoch lediglich unter

neurobiologischen Gesichtspunkten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Deletion von *Panx1* Auswirkungen auf die Folgeschäden einer zerebralen Ischämie und Reperfusion hat.

Die kardiale Funktion des Ionenkanals ist noch weitgehend unerforscht. Aufgrund seiner bisher bekannten Eigenschaften könnte *Panx1* am Herzen die Elektrophysiologie und somit die Entstehung und die Folgen eines Myokardinfarkts wie z.B. Apoptose, Fibrose und konsekutive Funktionseinschränkungen beeinflussen. Da die Ursachen eines Myokardinfarkts vielfältig und viele körpereigene Faktoren noch unbekannt sind, kommt der Aufklärung pathophysiologischer Mechanismen eines solchen Infarktgeschehens eine breite klinische Bedeutung zu.

Vor diesem Hintergrund wurden im vorliegenden Projekt die Auswirkungen einer kardialen Ischämie und Reperfusion *in vivo* an *Panx1*^{+/-}- und *Panx1*^{-/-}-Mäusen untersucht. Zu diesem Zweck wurden bei Mäusen beider Genotypen EKG-Transmitter implantiert. Anschließend wurde experimentell ein Myokardinfarkt ausgelöst. Vor und nach Ischämie wurden von jedem Versuchstier 24h-Elektrokardiogramme aufgezeichnet und echokardiographische Untersuchungen sowie Untersuchungen mit dem Millar-Katheter durchgeführt. Final wurden die Herzen entnommen und die Infarktgrößen planimetrisch bestimmt. Die Ergebnisse vor und nach Ischämie und die Unterschiede zwischen den Genotypen wurden miteinander verglichen. Parallel dazu wurden die Herzen nicht-operierter *Panx1*^{+/-}- und *Panx1*^{-/-}-Mäuse entnommen und histologisch untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Einfluss von *Panx1* auf die Infarktgröße sowie auf elektrophysiologische und hämodynamische Parameter vor und in der frühen Phase nach Ischämie und Reperfusion zu untersuchen, was zu einem besseren Verständnis der kardialen Funktion von *Panx1* beitragen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Systematischer und zeitlicher Aufbau der Versuchsreihe

Insgesamt wurden 22 Tiere in das Projekt eingeschlossen. Ein Tier musste nachträglich wegen anatomischer Anomalien ausgeschlossen werden und drei weitere verstarben während der Versuchsreihe. Bei den 18 verbleibenden Tieren handelte es sich um acht *Panx1*^{+/+}- und zehn *Panx1*^{-/-}-Mäuse.

Der zeitliche Ablauf des Projekts (**Abbildung 5**) gestaltete sich derart, dass bei den Tieren zunächst in einem Alter von 12-16 Wochen subkutan ein EKG-Transmitter implantiert wurde. Danach wurde eine Pause von zehn Tagen angesetzt, damit sie sich von der Operation erholen konnten. Außerdem war dieser Zeitraum wichtig, um einen eventuellen Einfluss der vorausgegangenen Anästhesie auf die Ergebnisse der nachfolgenden elektro- und echokardiographischen Untersuchungen auszuschließen (Redel *et al.*, 2009).

Nach dieser Pause fanden im Rahmen einer Baseline-Untersuchung eine EKG-Aufzeichnung über 24h und die Echokardiographie statt, durch die die physiologischen Funktionsparameter des Herzens erfasst wurden. Drei Tage später wurde bei einer Vor-OP die proximale linke Koronararterie (LAD) ligiert und damit die Ischämie vorbereitet. Nach dreitägiger Rekonvaleszenz wurde unter erneuter Narkose die Ischämie bei geschlossenem Thorax (*Closed-Chest-Modell*) ausgelöst und für 60min aufrechterhalten. Danach erfolgte die postischämische EKG-Aufzeichnung über 24h und eine erneute Echokardiographie. Anschließend wurde die Untersuchung mittels Druck-Volumen-Katheter durchgeführt. Mit der finalen Herzentnahme, -färbung und Infarktplanimetrie wurde die Versuchsreihe jeweils beendet.

Parallel zu diesen Versuchen wurden von jeweils zwei nicht-operierten *Panx1*^{+/+}- und *Panx1*^{-/-}-Mäusen die Herzen entnommen und Paraffinschnitte für eine qualitative Analyse der Herzstruktur angefertigt.

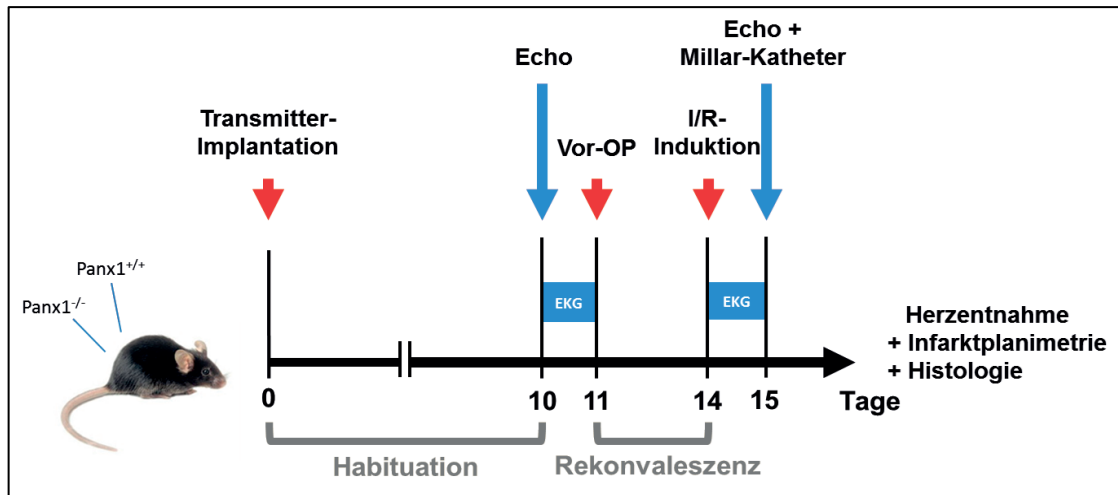


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Versuchsreihe. Zunächst wurde bei jedem Tier ein EKG-Transmitter implantiert und eine Habituation von zehn Tagen angesetzt. Danach fanden eine Echokardiographie und die EKG-Aufzeichnung über 24h statt. Drei Tage später wurde bei einer Vor-OP die LAD ligiert und damit die Ischämie vorbereitet. Nach dreitägiger Rekoneszenz wurde die Ischämie und Reperfusion (I/R) induziert. Danach erfolgte die postischämische EKG-Aufzeichnung über 24h und eine erneute Echokardiographie. Anschließend wurde die Untersuchung mittels Druck-Volumen-Katheter durchgeführt. Mit der finalen Herzentnahme, -färbung und Infarktplanimetrie wurde die Versuchsreihe jeweils beendet. Die Paraffineinbettungen für die Histologie fanden unabhängig von dieser Versuchsreihe zu einem späteren Zeitpunkt statt (Fotographie der Maus von harlan.com).

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Die *Panx1*-defiziente Maus

Die Etablierung der im vorliegenden Projekt verwendeten *Panx1*-defizienten transgenen Mauslinie erfolgte durch die Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. med. Hannah Monyer am Institut für Klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Heidelberg. Als genetischer Hintergrund wurde hierfür der Mausstamm C57BL/6 verwendet. Das *Panx1*-Gen wurde durch das Einfügen eines *lacZ*-Gens (Gen des Laktose-Operons von *Escherichia coli*) und einer von zwei loxP-Stellen (*Locus of Crossing Over in Phage P1*; Erkennungssequenz für Rekombinasen) flankierten Phosphoglycerat-Kinase-Neomycin-Kassette in Exon 1 unterbrochen. Das hierfür verwendete DNA-Fragment stammte von einer 129/SvJ-Mäusegenom-Bibliothek (Stratagene, California; Anselmi *et al.*, 2008). Das entstandene Zielkonstrukt wurde anschließend nach Elektroporation in R1-ES (Zelllinie R1) von 129/SvJ-Mäusen eingebracht. Eine erfolgreiche homologe Rekombination wurde mittels *Nested PCR* (geschachtelte PCR) und *Southern Blot*-Analyse bestätigt. Hierbei können ES, die die modifizierte DNA-Sequenz integriert haben, durch ihre Neomycin-Resistenz selektioiert werden.

Die selektionierten Neomycin-resistenten ES wurden anschließend in die Blastozysten von C57BL/6NCrl-Mäusen injiziert und die Nachkommen von Ammen ausgetragen. Die Übertragung des mutierten Allels in die Keimbahn wurde erneut durch *Southern Blot*-Analyse überprüft. Des Weiteren wurde die Neomycin-Kassette durch Verpaarung der Nachkommen mit sog. Cre-deleter-Mäusen aus dem Genom der Tiere entfernt (Anselmi *et al.*, 2008). Diese Tiere tragen das Gen für eine Cre-Rekombinase (*Cyclization Recombination*-Rekombinase), die spezifisch loxP-Stellen erkennt und DNA-Abschnitte zwischen diesen Stellen herausschneidet (Tang *et al.*, 2002). Schließlich wurde die neu entstandene transgene Linie zehn Generationen (N10) auf C57BL/6 rückgekreuzt. Die fortgeführte Zucht mit für die Mutation heterozygoten Tieren erzielte homozygote Panx1-Knockout-Mäuse in einem Mendelschen Verhältnis. Die vollständige Panx1-Deletion wurde unter Verwendung von Hirngewebe fünf Monate alter Mäuse mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) belegt. Die verwendeten Primer waren: Px1ex3-F, 5'-ACA CCT CTG CTC AGA CCT GAA-3' und Px1ex4-R, 5'-TGC ACA GAA ACT CGT CCG AGA-3'. So konnte die Panx1-DNA (336bp, Exon 3-4) beim Panx1-Wildtyp nachgewiesen werden, beim Panx1-Knockout hingegen nicht (Anselmi *et al.*, 2008).

Von dieser Stelle wurden unserer Arbeitsgruppe 2010 mehrere Zuchtpaare der zehnten Rückkreuzungsgeneration für die kardiologische Forschung an Panx1 zur Verfügung gestellt. Mit diesen Tieren wurde nachfolgend unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. Birgit C. Donner im kardiovaskulären Forschungslabor der Kinderkardiologie, Universitäts-Kinderklinik Düsseldorf, eine neue Zuchtlinie aufgebaut. Diese wurde als Auszucht geführt, da eine vorausgegangene Inzucht zu schlechten Zuchtergebnissen und hohen Sterberaten geführt hatte.

2.2.2 Genotypisierungen

Die Genotypisierungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Mariam Taleb im kinder-kardiologischen Labor des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) durchgeführt.

2.2.2.1 DNA-Präparation

Zur Bestimmung des Genotyps wurden den Tieren im Alter von 4-5 Wochen die Schwanzspitzen (1-2mm Länge) abgetrennt, um daraus die genomische DNA zu isolieren. Bis zur Durchführung der Genotypisierung wurden die Schwanzspitzen zunächst in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität (HHU) bei -80°C und nach dem Transport in das kardiologische Labor bei -20°C gelagert.

Zur DNA-Präparation wurde ein kommerzielles *QIAGEN DNeasy Blood and Tissue Kit* verwendet und nach dem darin enthaltenen standardisierten Protokoll vorgegangen. Hierfür wurden die Schwanzspitzen unmittelbar nach Unterbrechung der Kühlkette in einem 1ml-Reaktionsgefäß mit 180µl *ATL*-Puffer und 20µl *Proteinase K* über Nacht bei 56°C in einem Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde das Lysat zur Isolierung der DNA in sog. *Spin Columns* mit *Collection Tubes* (kleine Filtergefäße mit integrierten Auffangbehältnissen) überführt.

In diese wurden nacheinander 200µl *AL*-Puffer und 200µl Ethanol gegeben und die Proben zentrifugiert (1min, 8000RPM, $\geq 6000 \times g$). Nach Verwerfen des Durchflusses wurden 500µl *AW1*-Puffer hinzugefügt und die Proben nochmals zentrifugiert (1min, 8000RPM, $\geq 6000 \times g$). Es folgte erneutes Verwerfen des Durchflusses. Dann wurden weitere 500µl *AW2*-Puffer dazugegeben und die Proben über 3min (14000RPM, $\geq 20000 \times g$) zentrifugiert. Diese Schritte dienten dazu, im Lysat enthaltene Zellreste und Schmutz zu entfernen.

Das *Spin Column* wurde nun auf ein beschriftetes Auffanggefäß überführt. Durch die Zugabe von 100µl *AE*-Puffer, eine Inkubation über 1min und eine letzte Zentrifugierung (1min, 8000RPM, $\geq 6000 \times g$) wurde die noch enthaltene DNA durch eine in dem *Spin Column* enthaltene Membran in das Auffanggefäß filtriert.

2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation der isolierten DNA

Zur Vorbereitung der PCR wurde zunächst die enthaltene DNA-Menge in jeder Probe bestimmt. Hierzu wurde eine Spektrophotometrie mittels Spektralphotometer laut Herstellerangaben durchgeführt. Dieses misst in den Proben die Reflexion bzw. Transmission von Strahlen innerhalb verschiedener Wellenlängen, die abhängig ist von der darin enthaltenden DNA-Menge. Daraus ergibt sich eine Mengenbestimmung in ng/μl. Die DNA-Konzentration in den Proben wurde auf einer Wellenlänge von 260nm berechnet, da sich hier das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren befindet. Die entsprechende Formel leitet sich aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz ab und lautet:

$$c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = (OD_{260} \times \epsilon_{\lambda})/d$$

c :	Konzentration der Ausgangslösung
OD_{260} :	Gemessene optische Dichte bei 260nm
ϵ_{λ} :	Extinktionskoeffizient (DNA: 50μg/ml)
d :	Schichtdicke des durchstrahlten Körpers (m)

Zusätzlich lässt sich durch die Berechnung des Verhältnisses der OD_{260} zur OD_{280} (Absorptionsmaximum von Proteinen) die Reinheit der DNA bestimmen. Liegt der Quotient bei 1,8, gilt die DNA als rein ohne Hinweise auf signifikante Verunreinigungen durch Proteine. Ein kleinerer Quotient weist auf eine Protein- oder Phenol-Kontamination hin. Dies könnte im Folgenden zu einer Störung der Amplifikation durch die PCR führen. Zur Aufbereitung der Proben für die PCR wurden aus jeder DNA zwei Reaktionsansätze erstellt (s.u.) und jeweils 20μl DNA-Polymerase hinein pipettiert. Für die Detektion der *Panx1*^{+/+}-Mäuse wurde anschließend in eine der Proben jeweils 1μl Primer 1 (Geno Pxn1, Konzentration 1:10) und Primer 2 (Geno Pxn2, Konzentration 1:10) pipettiert. Die Primer flankierten einen DNA-Bereich von 330 Basenpaaren (BP), der amplifiziert werden sollte. Für die Markierung der *Panx1*^{-/-}-Tiere stand entsprechend eine Kombination aus Primer 1 und Primer 3 (Geno Pxn3, Konzentration 1:10) zur Verfügung, die in die zweite Probe pipettiert wurde und einen DNA-Bereich von 630BP flankierte. In beide Proben wurden zum Schluss, abhängig von der Konzentration der DNA in der Ursprungsprobe, die DNA und Wasser (*Aqua bidest*)

gegeben (Gesamtmenge der Probe: 40µl). Darüber hinaus wurde zum Ausschluss einer Kontamination je eine Probe mit beiden Primerpaaren, aber ohne DNA, hergestellt (Leerprobe).

Die Amplifikation erfolgte in einer PCR-Maschine und wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt:

Tabelle 1: Amplifikationsschema der PCR-Maschine. Nach der Denaturierung der Mäuse-DNA und der Anlagerung der Primer (Primerhybridisierung) sowie der Polymerase an die Einzelstränge wird die DNA in Richtung der Zielsequenz verlängert (Elongation). Durch die Wiederholung dieser Schritte lässt sich die DNA exponentiell amplifizieren.

Anzahl Zyklen	Programm	Temperatur (°C)	Dauer (s)
1 x	Initiale Denaturierung	95	300
30 x	Denaturierung	95	15
	Primerhybridisierung	55	20
	Elongation	72	30
1 x	Finale Elongation	72	300
1 x	Abkühlung	4	Bis zur Entnahme der Proben

2.2.2.3 Gelelektrophorese

Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem 2%-Agarosegel (Agarose + TRIS-Borat-EDTA-Puffer) separiert. Als Größenmarker wurde eine 100BP-Ladder verwendet (Markierung alle 100BP). Die DNA wurde durch Ethidiumbromid angefärbt und mit Hilfe eines speziellen Geldokumentationssystems die in den Proben enthaltene DNA sichtbar gemacht (**Abbildung 6**) und der Genotyp bestimmt.

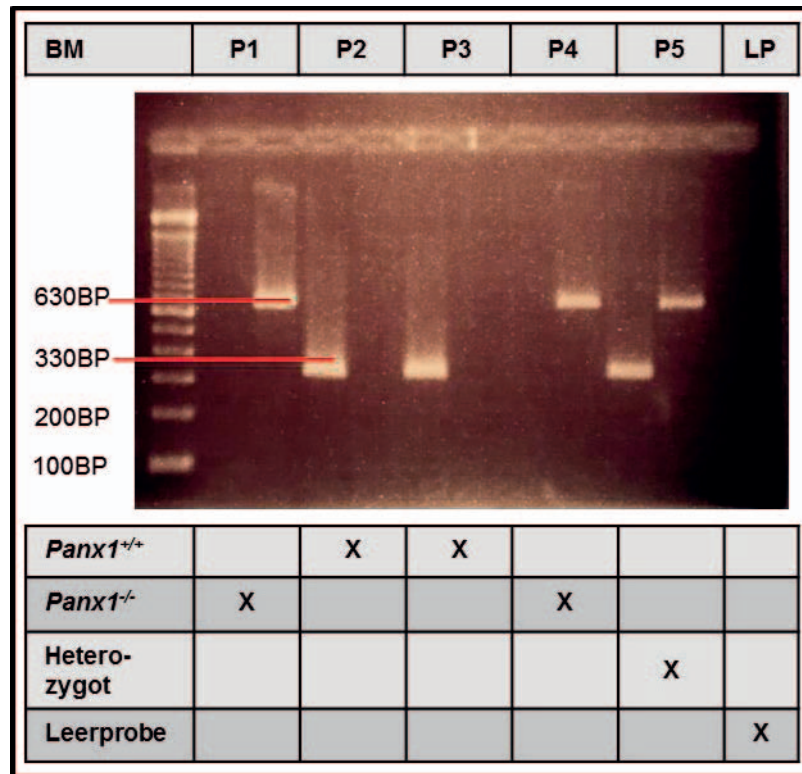


Abbildung 6: Bandendarstellung nach der Gelelektrophorese. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und macht die Stränge dadurch unter ultraviolettem Licht auf einer Höhe von 330 und 630BP als Banden im Gel sichtbar, sodass der Genotyp der Tiere bestimmt werden kann. BM = Bandenmarker (markiert alle 100BP), P1-P5 = Jeweils zwei Reaktionsansätze der einzelnen Tiere, LP = Leerprobe.

2.2.3 Tierhaltung

Alle Versuchstiere wurden in der ZETT der HHU gehalten.

2.2.3.1 Zucht

Die Haltung der Zuchtpaare erfolgte in mit entstaubtem Weichholzgranulat eingestreuten Makrolonkäfigen Typ II (350cm³, Höhe 14cm) oder Typ III (800cm³, Höhe 14cm). Als Rückzugsmöglichkeit und für den Nestbau dienten den Tieren Kunststoffhäuschen. Die drei Wochen alten Jungtiere wurden von der Mutter abgesetzt, nach Geschlechtern getrennt und anschließend in Geschwistergruppen gehalten. Im Alter von vier bis fünf Wochen wurde für die DNA-Analyse eines jeden Tieres die Schwanzspitze gekürzt und eine individuelle Ohrlochung zur genauen Identifizierung durchgeführt. Nach der Bestimmung des Genotyps und mit Erreichen der Geschlechtsreife (im Alter von mindestens 12 Wochen)

gingen die Tiere entweder in den Versuch oder wurden zur weiteren Zucht verpaart. Es wurden bevorzugt heterozygote Geschwistertiere verpaart, um homozygote Merkmalsträger zu erhalten. Um die Linienführung zu verbreitern und somit einer Inzucht entgegenzuwirken, wurden zwischenzeitlich auch C57Bl/6-Mäuse eingekreuzt. Auf diese Weise wurde die Zahl der Merkmalsträger erhöht. Anhand des Zuchtbuchs und der Sterbetafeln wurde der Zuchterfolg (Wurfstärke/Überlebende Welpen) kontinuierlich überprüft.

In den Zuchträumen lagen die Raumtemperatur bei 22 ± 2 °C und die relative Luftfeuchte bei $55 \pm 5\%$. Die Beleuchtung (320lx) fand von 6:00 bis 18:00 Uhr MEZ statt. Die Tiere wurden mit pelletiertem autoklaviertem Futter *ad libitum* gefüttert. Ebenfalls *ad libitum* stand den Tieren ozoniertes mit HCL angesäuertes Leitungswasser (pH 2,6-3,0) in Nippel-Trinkflaschen zur Verfügung.

2.2.3.2 Versuchstiere

Bis zum Tag der Transmitter-Implantation fand die Haltung der Versuchstiere gemeinsam mit den Zuchttieren statt. Danach wurden sie einzeln in Makrolon-käfigen Typ II in Tierhaltungsräume verbracht, um eine gegenseitige Manipulation an den Wundrändern zu vermeiden. Die Einstreu und Wasserversorgung entsprachen hier der in den Zuchträumen, genauso wie die Raumtemperatur und relative Luftfeuchte. Die Tiere wurden weiterhin *ad libitum* gefüttert. Zur Beschäftigung sowie als Rückzugsmöglichkeit diente zerkleinerter Zellstoff. Es wurden täglich das Allgemeinbefinden, das Verhalten und die Gewichtsentwicklung der Tiere überprüft, außerdem wurden nach erfolgten Operationen die Wundränder kontrolliert und die Schmerzmedikation (entsprechend dem Protokoll des Tierversuchsantrags) vorgenommen.

Um den zirkadianen Rhythmus der Tiere nicht zu stören, wenn tagsüber (zu deren eigentlicher Ruhephase) mit ihnen gearbeitet wurde, unterlag die Beleuchtung in den Haltungsräumen einem reversen Tag-Nacht-Rhythmus.

2.2.3.3 Genehmigung

Das Versuchsvorhaben wurde von der Bezirksregierung Düsseldorf unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2012.A343G343/13 genehmigt. Die Organentnahmen für die Histologie wurden ebenfalls durch die Bezirksregierung Düsseldorf unter der Kennziffer G/254/2012 genehmigt.

2.3 Funktionelle nicht-invasive Untersuchungen mittels Echokardiographie

2.3.1 Grundlagen

Die Echokardiographie ermöglicht eine Analyse der Morphologie und der Funktion des Herzens. Es handelt sich hierbei um ein sonographisches Verfahren, bei dem Ultraschallwellen von einem Schallkopf ausgehend auf verschiedene Gewebe treffen und an den Grenzflächen gebrochen, abgelenkt, absorbiert und reflektiert werden. Die reflektierten Wellen werden zu ein- (M-Mode-Verfahren) bzw. zweidimensionalen Bildern (B-Mode-Verfahren) umgewandelt. Anhand dieser Bilder können anschließend bspw. Vorhof- und Ventrikelgröße, Klap-penmorphologie und -veränderungen sowie der Blutfluss über die einzelnen Klappen beurteilt werden.

2.3.2 Durchführung

Die Bildaquisition erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Simone Gorreßen im kardiologischen Labor des UKD.

Hierfür wurden ein hochauflösendes Ultraschallgerät und ein 18-38MHz-Schallkopf verwendet. Alle Versuchstiere (acht *Panx1*^{+/+}- und zehn *Panx1*^{-/-}-Mäuse) wurden mindestens 24h vor der Ischämie sowie 6h danach echokardiographisch untersucht. Hierfür wurden die Tiere zunächst in einer Narkosekammer durch Flutung mit einem Sauerstoff-Isofluran-Gemisch (3Vol% Isofluran) anästhesiert. Die Narkoseerhaltung erfolgte anschließend ebenfalls mit einem Gasgemisch (1-1,5% Isofluran/O₂) über eine Atemmaske.

Für die Untersuchung wurden die Tiere nach Feststellung einer ausreichenden Anästhesie in Rückenlage auf ein beheizbares Elektroden-Kontakt-Pad ver-

bracht und die Extremitäten auf den EKG-Elektroden fixiert (**Abbildung 7**). Zusätzlich wurde eine Temperatursonde rektal eingeführt. So konnten kontinuierlich die HF (400-550/min), die AF (80-120/min), ein EKG und die Körpertemperatur (36-38°C) aufgezeichnet und überprüft werden.

Die Vorbereitung der Thoraxregion erfolgte zunächst grob mit Hilfe eines Rasierers, danach wurde dieser Bereich mittels Enthaarungscreme vollständig enthaart. Anschließend wurde bereits angewärmtes blasenfreies Ultraschallgel auf dem Thorax verteilt.

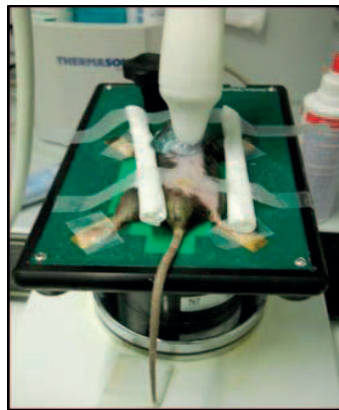


Abbildung 7: Positionierung des Versuchstieres auf dem Elektroden-Kontaktpad.

Es folgte die standardisierte echokardiographische Untersuchung nach Collins (Collins *et al.*, 2003):

1. Parasternaler Langachschnitt (Darstellung des linken Ventrikels inklusive *Apex*, LVOT und *Aorta ascendens*)

Hierfür wurde der Tisch in Kopfrichtung der Maus (rostral) und schräg nach links etwas geneigt. Der Schallkopf wurde leicht schräg parallel zum Sternum bewegt und das Herz im B-Mode geschallt (**Abbildung 8**). Dann wurde in den M-Mode gewechselt und das Herz in dieser Einstellung auf Höhe der Papillarmuskeln untersucht.

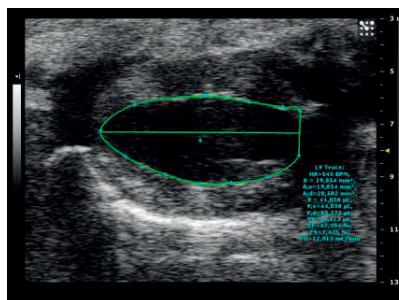


Abbildung 8: Darstellung des Herzens im B-Mode der langen Achse. Die grüne Linie markiert die Umrisse des Herzens in der Längsachse.

2. Parasternaler Kurzachsenschnitt (Darstellung des geringsten (apexnah) und des größten (basisnah) Ventrikeldurchmessers sowie in der Mitte des Ventrikels auf Höhe der Papillarmuskeln)

Der Tisch blieb in o.g. Position und der Schallkopf wurde im Uhrzeigersinn in Projektion auf die linke Schulter rotiert (**Abbildung 9**). In dieser Einstellung wurde das Herz im B-Mode dargestellt (**Abbildung 10**).



Abbildung 9: Positionierung des Schallkopfs im parasternalen Kurzachsenschnitt.

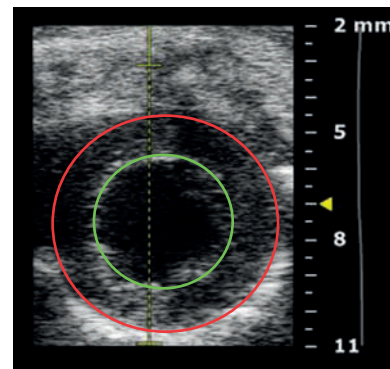


Abbildung 10: Darstellung des Herzens im B-Mode der kurzen Achse. Die grüne Linie markiert den Innendurchmesser des Ventrikels im Querschnitt, die rote Linie den Außendurchmesser.

Anschließend wurde das Herz auch im Kurzachsenschnitt im M-Mode untersucht. Aus drei im B-Mode gewonnenen Aufnahmen (basal, medial und apikal) ließen sich zunächst basierend auf der Simpson-Formel (Lang *et al.*, 2006) das linksventrikuläre endsystolische (LVESV) und das enddiastolische (LVEDV) Volumen ermitteln. Anhand der Volumina wurden die Ejektionsfraktion (EF), das Schlagvolumen (SV), sowie das Herzminutenvolumen (CO) berechnet. Sie dienen als Parameter für die systolische Herzfunktion:

$$EF (\%) = \frac{LVEDV - LVESV}{LVEDV} \times 100$$

$$SV (\mu l) = LVEDV - LVESV$$

$$CO \left(\frac{ml}{min} \right) = SV \times HR$$

Die Untersuchung des linken Ventrikels im M-Mode diene der genaueren Evaluierung der Wanddicken und Ventrikel-Dimensionen. Zusätzlich wurde die Verkürzungsfraction (FS) berechnet. Sie spiegelt wider, um wie viel Prozent sich der linke Ventrikel in der Systole (LVESD) gegenüber der Diastole (LVEDD) verkleinert:

$$FS \text{ (in \%)} = \frac{LVEDD - LVESD}{LVEDD} \times 100$$

3. Apikaler Vier-Kammer-Blick (Darstellung der Vorhöfe, der Mitral- und der Trikuspidalklappe, der Ventrikel und des Septums)

Der Tisch wurde in rostraler Richtung geneigt und der Schallkopf flach aus apikaler Richtung eingestellt:



Abbildung 11: Position des Schallkopfes beim apikalen Vierkammerblick.

Neben der morphologischen Analyse diene der apikale Vierkammerblick der Messung des Flussprofils über die Mitralklappe (mittels PW-Doppler). Aus den erhobenen Daten konnten folgende Parameter zur Bestimmung der diastolischen Herzfunktion ermittelt werden:

MV A Vel (mm/s):	A-Welle
MV E Vel (mm/s):	E-Welle
MV E/A:	Verhältnis der E- zur A-Welle

Die E-Welle repräsentiert den Einfluss des Blutes in den linken Ventrikel durch die frühdiastolische Relaxation, beschreibt also einen passiven Prozess. Die A-Welle hingegen bezeichnet den aktiven Einstrom von Blut durch die spätdiastolische Vorhofkontraktion. Physiologisch ist eine höhere Geschwindigkeit der E-Welle. Eine diastolische Dysfunktion geht im Frühstadium mit einer Störung der Ventrikel-Relaxation einher und verschiebt dadurch das Verhältnis durch eine niedrigere Geschwindigkeit der E-Welle in Richtung eines größeren Quotienten.

4. Suprasternale Aufnahme (Darstellung der Aortenklappe und der *Aorta ascendens*)

Hierfür wurde der Tisch aus horizontaler Position in rostraler Richtung etwas erhöht eingestellt und der Schallkopf in gleicher Richtung leicht gekippt bewegt.

Die suprasternale Aufnahme wurde für die Bestimmung des Blutflusses über die Aortenklappe mittels PW-Doppler verwendet. Daraus ergab sich als Parameter:

AoV Peak Vel (mm/s): Maximale Blutflussgeschwindigkeit über die Aortenklappe

Alle Schnittebenen wurden hinsichtlich regionaler Wandbewegungsstörungen (Dyskinesie, Hypokinesie, Akinesie) untersucht und diese dokumentiert.

Nach der Durchführung der Echokardiographie wurden das Kontakt- und das Ultraschallgel von dem Tier entfernt und das Tier während der Aufwachphase zur besseren Abflutung des Narkosegases mit 100% Sauerstoff begast. Der Käfig des Tieres wurde anschließend zur Unterstützung der Thermoregulation bis zur vollständigen Rekonvaleszenz von der Narkose unter einer Wärmelampe positioniert.

2.3.3 Auswertung

Die bei der echokardiographischen Untersuchung erhobenen Daten wurden mittels der Software *Vevo 2100* zusammen mit Frau Dr. rer. nat. Simone Gorreßen ausgewertet und statistisch analysiert.

2.4 Durchführung einer Ischämie und Reperfusion

2.4.1 Hintergrund und Bedeutung des *Closed-Chest*-Modells

Bei der Ischämie und Reperfusion im Rahmen eines sog. *Closed-Chest*-Modells handelt sich um ein im Jahr 1995 erstmals beschriebenes Tiermodell (Michael *et al.*, 1995), das u.a. in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Marc W. Merx etabliert und in zahlreichen Studien veröffentlicht wurde (u.a. Hendgen-Cotta *et al.*, 2008). Der Ursprungsgedanke dieses Modells bestand darin, die Ligatur eines Gefäßes (Vor-OP) und das eigentliche Festziehen dieser Ligatur (Ischämie-Induktion) zeitlich durch einen Mindestabstand von 3 Tagen voneinander zu trennen (Nossuli *et al.*, 2000), sodass es möglich ist, bei der anschließenden Entzündungsantwort zwischen der Reaktion auf den chirurgischen Eingriff und der auf die Ischämie zu unterscheiden.

Der durch die Ligatur der LAD künstlich erzeugte akute Myokardinfarkt führt zum Verschluss der Arterie und folglich zur Nekrose des entsprechenden Versorgungsgebiets. Daraus resultieren, je nach Lokalisation des infarzierten Gefäßes, Störungen des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems. Abhängig von der Stärke der Veränderungen werden diese im EKG sichtbar. Als besonders charakteristisches reversibles Infarktzeichen gilt eine monophasisch deformierte ST-Strecke (ST-Hebung), deren Auftreten beim Menschen auch für die Einteilung des Infarktes in STEMI (Myokardinfarkt mit ST-Hebung) und NSTEMI (Myokardinfarkt ohne ST-Hebung) von Bedeutung ist (Arastéh *et al.*, 2009, S.58; Hahn, 2013).

Alle im Rahmen des *Closed-Chest*-Modells durchgeführten Untersuchungen fanden als Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. med. Marc W. Merx im kardiologischen Labor des UKD statt. (Klinik für Angiologie und Pneumologie, Ärztlicher Direktor Herr Prof. Dr. med. Malte Kelm).

2.4.2 Anlage einer Ligatur um die LAD (Vor-OP)

Die Vor-OP erfolgte in Zusammenarbeit mit der veterinärmedizinisch-technischen Assistentin (VMTA) Frau Stefanie Becher.

Für die Anlage der Ligatur um die proximale linke Koronararterie wurde das Versuchstier zehn Tage nach der Transmitter-Implantation erneut mit einer int-

raperitonealen Mischspritze (100mg/kg KGW Ketamin und 10mg/kg KGW Xylazin) narkotisiert. Nach Feststellung einer ausreichenden Anästhesie wurde die linkslaterale Seite des Thorax rasiert. Mittels einer modifizierten Venenverweilkanüle erfolgte anschließend die Intubation (Der Kunststoffkatheter dieser Kanüle war zuvor gekürzt und abgerundet worden, um Verletzungen der Trachea zu vermeiden). Der Kopf der Maus wird hierfür in einem dafür geeigneten Intubationsständer überstreckt. Zur besseren Orientierung wird eine Lichtquelle von außen auf Höhe der Epiglottis auf die Kehle gerichtet. Die Zunge kann nun vorsichtig mit einer Pinzette so zur Seite geschoben werden, dass eine tracheale Intubation möglich ist. Danach wird das Tier umgehend an den Respirator angeschlossen und der korrekte Sitz des Tubus in der Trachea durch milde Ausschläge des Volumeters überprüft.

Die Fixierung in Rückenlage erfolgte durch Klebestreifen auf einem beheizbaren Operationstisch für Kleintiere (37°C), anschließend wurde das Tier zur Narkoseerhaltung mit einem Sauerstoff-Isoflurangemisch (FiO₂ 40%, 2Vol% Isofluran) bei einer Beatmungsfrequenz von 140 Atemzügen/min begast. Unmittelbar vor OP-Beginn wurde die freirasierte Thoraxhälfte zusätzlich enthaart und mittels Iodlösung desinfiziert.

Der Zugang zum Herzen erfolgte über eine linksseitige Thorakotomie. Dafür wurde zu Beginn die Haut auf ca. 1cm Länge inzidiert. Unter Verwendung eines Operationsmikroskops wurde anschließend auf Höhe des 3. Interkostalraums stumpf durch den Brustmuskel präpariert (ca. 0,5cm Schnittlänge) und der Brustkorb eröffnet. Um die weitere Präparation zu erleichtern, wurde die Brustmuskulatur mit Hilfe zweier OP-Haken, die jeweils über einen dünnen Metallstab an einem Magnethalter befestigt waren, retrahiert.

Nach Eröffnung des Herzbeutels und Aufsuchen der LAD ca. 1mm kaudal des linken Herzhorns wurde diese distal der Bifurkation von LAD und ihres *Ramus diagonalis* mit Hilfe eines *PROLENE 7-0*-Fadens umschlungen. Die beiden Enden des Fadens wurden nach Abschneiden der Nadel durch ein desinfiziertes Stückchen eines Polyethylen-Schlauchs (0,5mm Ø, 1mm Länge, zuvor in Ethanol eingelegt) geführt und so festgezogen, dass sich eine lockere Schlaufe um die LAD bildete, diese jedoch nicht okkludiert war. Nur kurzzeitig wurde die Ligatur fester zugezogen, um durch die sofortige Durchblutungsminderung des Apex den richtigen Sitz der Ligatur zu beurteilen.

Der Verschluss des Thorax sowie der Muskelschicht erfolgte mit Einzelheften (*PERMA-HAND 4-0*-Seidenfaden), wobei die Enden des *PROLENE*-Fadens zwischen den Einzelheften nach subkutan geführt und miteinander verknotet wurden. Um einem Alveolarkollaps nach Eröffnung des Thorax entgegenzuwirken, wurde unmittelbar vor dem endgültigen Verschluss des Thorax durch kurzzeitige (1-2s) Erhöhung des inspiratorischen Drucks ein Recruitment-Manöver ausgelöst. Rechtsthorakal erfolgte die stumpfe Präparation einer Hauttasche mit einer kleinen Hautschere, in die anschließend der *PROLENE*-Faden aufgerollt platziert werden konnte. Zum Schluss wurde die Haut mittels Einzelheften (*PROLENE 5-0*) verschlossen.

Die Operationsnarbe wurde nochmals mit Iodlösung desinfiziert. Die Isofluranarkose wurde beendet, das Tier aber noch weiter mit O₂-angereicherter Raumluft (1/3 100%iger O₂ und 2/3 Raumluft) begast. Sobald es wieder Reflexe zeigte, erfolgte die Extubation, und das Tier wurde in seinen Käfig verbracht, der zur Unterstützung der Thermoregulation bis zur vollständigen Rekonvaleszenz von der Narkose unter einer Wärmelampe positioniert wurde.

In den folgenden 6-8 Tagen schlossen sich eine intensive Überwachung der Tiere und die Verabreichung von Buprenorphin (alle 6-8h, 0,05-0,1mg/kg, s.c.) zur Schmerzstillung an.

2.4.3 Induktion der Ischämie bei geschlossenem Thorax

Die Induktion der Ischämie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau VMTA Stefanie Becher.

Zwischen der Anlage der Ligatur und der Ischämie-Induktion wurde ein Zeitfenster von 3 Tagen gewählt. Am Tag der Ischämie wurde das Tier nach suffizienter Anästhesie erneut in Rückenlage auf den beheizten (37°C) Operationstisch verbracht und wie oben beschrieben fixiert. Zur Narkoseüberwachung und Kontrolle der Ischämie wurden dem Tier EKG-Elektroden angelegt. Die Narkoseerhaltung erfolgte über eine Atemmaske (1/3 100%iger O₂ und 2/3 Raumluft, 2Vol% Isofluran). Nach Desinfektion des OP-Feldes im Bereich der Hautnaht mit Iodlösung wurde diese erneut eröffnet. Die subkutan verbliebenen Fadenenden wurden freigelegt, der Knoten abgeschnitten und die beiden Enden voneinander getrennt nach links bzw. rechts vom Tier weggeführt. Seitlich des Tieres wurden sie nun zunächst jeweils mittels Klebestreifen locker an einem Mag-

nethalter befestigt. Erst dann folgte die Ischämie-Induktion durch das vorsichtige Wegziehen der Magnethalter vom Tier, wodurch die Fadenenden unter Spannung gerieten. Die visuelle Kontrolle erfolgte parallel durch die ST-Streckenhebung im EKG. Unter kontinuierlicher Kontrolle der Narkose und der Fadenspannung wurde die Ischämie nun über einen Zeitraum von 60min fortgesetzt. Um ein Austrocknen und den Eintrag von Keimen zu vermeiden, wurde die eröffnete Haut mit einem mit NaCl (0,9%) getränkten sterilen Gazetupfer abgedeckt.

Nach Ablauf der 60min wurde die Ischämie durch das Durchtrennen der beiden Fadenenden beendet. Diese wurden kurz abgeschnitten und die Hautnaht nach Wundaufrischung erneut mit Einzelheften (*PROLENE 5-0*) verschlossen. Die Isoflurannarkose wurde beendet und die Maus noch einige Minuten mit O₂-angereicherter Raumluft (s.o.) begast. Nach der Wiedereinstellung der Reflexe wurde das Tier in den Käfig verbracht. Die postoperative Überwachung und Behandlung gestaltete sich wie bereits weiter oben beschrieben.

2.4.4 *Evans Blue*- und TTC-Färbung zur Vorbereitung einer Infarktplanimetrie

Diese erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau VMTA Stefanie Becher.

Um die Größe des durch die experimentelle Ischämie entstandenen Infarktes zu bestimmen und zwischen den Genotypen zu vergleichen, wurden die Herzen eines jeden Versuchstieres entnommen, zweifach gefärbt und anschließend eine Infarktplanimetrie durchgeführt.

Zeitlich schlossen sich die Herzentnahme und -färbung unmittelbar an die Druck-Volumen-Messung mit dem Millar-Katheter (**vgl. Kapitel 2.6**) an. Hierfür wurden die Tiere zunächst tief narkotisiert (100mg/kg KG Ketamin und 10mg/kg KG Xylazin, i.p.). Die Suffizienz der Narkose wurde überprüft und anschließend der Brustkorb eröffnet und das Herz entnommen. Zur Vorbereitung der Färbung musste das Herz in einer Kaltschale mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung; 4°C) unter einem Operationsmikroskop von umgebenden Geweberesten freipräpariert werden. Mittels zweier Mikropinzetten konnte der Aortenstumpf anschließend auf eine spezielle Aortenkanüle aufgezogen und mit einem Fadenknoten (Seidenfaden *SERAFEX 5-0*) fixiert werden. Über die Kanüle wurde das Herz anschließend mittels NaCl blutfrei gespült. Außerdem wurde an der Stelle,

an der die LAD zuvor *in vivo* ligiert worden war, erneut eine Ligatur (*SERAFEX* 5-0) gesetzt. Durch die Kanüle war es weiterhin möglich, retrograd über die Koronararterien das gesunde Herzgewebe mit 1%igem *Evans Blue* (1-2ml) blau anzufärben. Das Versorgungsgebiet distal der Ligatur blieb entsprechend ungefärbt.

Anschließend wurde das Herz gewogen und bei -20°C über den Zeitraum von 1h eingefroren. Im Anschluss wurde das Herz von der Herzspitze aufwärts mit einer Rasierklinge transversal in ca. 1mm dicke Scheiben geschnitten und die Schnitte auf einer Feinwaage gewogen. Für die zweite Färbung wurde jeder Schnitt in einem 1ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mittels 1%igem 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) 5min bei 37°C in einem Thermomixer inkubiert. Der wasserlösliche Redox-Farbstoff wird dabei von mitochondrialen Dehydrogenasen noch intakter Zellen mit Hilfe der Coenzyme NAD und NADP zu dem roten Indikator Formazan reduziert.

Die gefärbten Schnitte wurden schließlich unter einem Stereomikroskop abfotografiert und die Daten für die Infarktplanimetrie auf einen angeschlossenen PC transferiert und gespeichert.

2.4.5 Infarktplanimetrie zur Ermittlung der Infarktgröße

Die Infarktplanimetrie (**Abbildung 12**) erfolgte mit dem Programm *DISKUS* Software und wurde verblindet durchgeführt. Grundlage hierfür bot die unterschiedliche Anfärbung der Herzbereiche: Physiologisches Gewebe färbt sich durch das *Evans Blue* blau-violett an, die sog. *Area At Risk* (AAR), die noch lebende Zellen enthält, jedoch im Versorgungsgebiet der ligierten Koronararterie liegt, stellt sich durch die Reduktion des TTCs rot dar und vollständig ligiertes und reaktionsloses Infarktgewebe erscheint weiß-rosa:

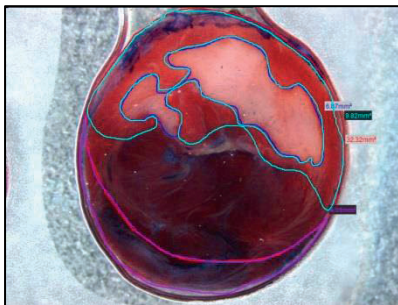


Abbildung 12: Infarktplanimetrie mit der DISKUS-Software. Im unteren Bereich des Bildes befindet sich physiologisches Myokard (blau-violett, rot umrandet), oben rechts der Infarkt (weiß-rosa, blau umrandet), zwischen vitalem Myokard und Infarkt demarkiert sich die AAR (rot, grün umrandet).

Man umfährt mit dem Cursor die entsprechenden Bereiche (Infarkt, AAR) für die computergestützte Flächenberechnung. Durch das Ausmessen aller Herzscheiben ist eine Volumetrie möglich. Die Größe des Myokardinfarkts berechnet sich demnach wie folgt (Michael *et al.*, 1995):

$$[(A1 + Wt1) + (A2 + Wt2) + (A3 + Wt3) + (A4 + Wt4) + (A5 + Wt5) + (A6 + Wt6)] \\ = \text{Gewicht Infarktgewebe}$$

A = Prozentuale Fläche des Infarkts der Schnitte 1-6

Wt = Gewicht der entsprechenden Schnitte 1-6

Anschließend lässt sich anhand folgender Formel der prozentuale Anteil des Infarkts am linken Ventrikel (LV) berechnen:

$$\frac{\text{Gewicht Infarkt}}{\text{Gewicht LV}} \times 100 = \text{Anteil Infarkt am LV in \%}$$

Die AAR ergibt sich schließlich anhand dieser Formel:

$$\frac{(\text{Gewicht LV} - \text{Gewicht blau gefärbter Anteil LV})}{\text{Gewicht LV}} = \text{Anteil AAR am LV in \%}$$

Sie wird bezogen auf die Gesamtfläche des LV angegeben, um Schwankungen der Herzgröße auszugleichen.

2.5 Aufzeichnung eines telemetrischen Elektrokardiogramms

2.5.1 Das EKG - Grundlagen und Unterschiede zwischen Mensch und Maus

Die Elektrokardiographie misst elektrische Potentiale während der Herzaktion (Arastéh *et al.*, 2009, S.27). Durch die Depolarisation der Herzmuskelzellen entstehen Spannungsunterschiede zu noch nicht erregten Zellen, die mittels verschiedener Ableitungsformen gemessen werden können.

Die telemetrische EKG-Aufzeichnung ermöglicht eine Analyse der Herzaktion der Versuchstiere unter nahezu physiologischen Bedingungen und gilt derzeit

als Goldstandard für nicht-invasive elektrophysiologische Analysen an transgenen Mäusen. Allerdings müssen bei der Bewertung des murinen EKGs einige Besonderheiten beachtet werden. Es bestehen Unterschiede zwischen dem Übergang von der De- in die Repolarisationsphase im menschlichen Herzen im Vergleich zu dem in einem Mäuseherzen. So fehlt bei der Maus eine deutliche Plateauphase (**Abbildung 13**) wodurch es zu einer Überlappung der De- und Repolarisation kommt (Speerschneider *et al.*, 2013).

Im menschlichen EKG ist das Ende der ventrikulären Depolarisation mit dem J-Punkt klar vom Beginn der ST-Strecke abgrenzbar. Die ST-Strecke korreliert mit der Plateauphase des APs, also dem Stadium, in dem alle Kardiomyozyten des Ventrikels vollständig erregt sind. Da zu diesem Zeitpunkt keine Potentialdifferenzen messbar sind, verläuft die Strecke im EKG entlang der isoelektrischen Linie, und leitet die intraventrikuläre Erregungsrückbildung ein.

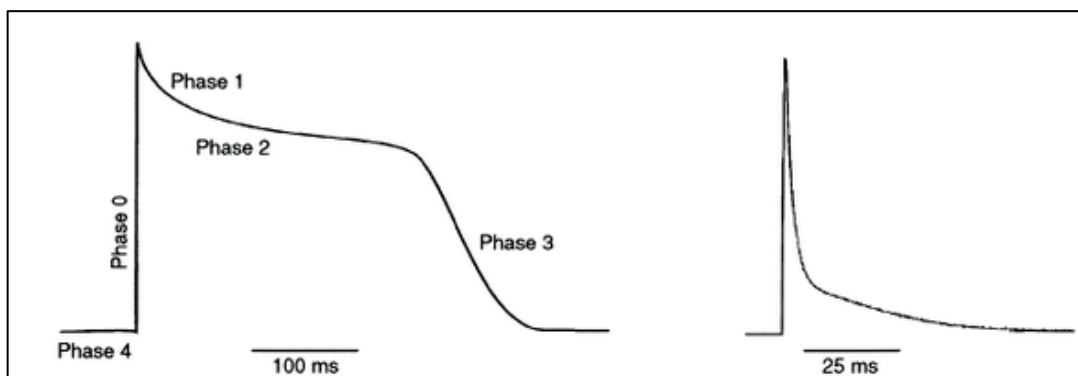


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Aktionspotentials ventrikulärer Myozyten eines erwachsenen Menschen (links) im Vergleich mit dem einer Maus (rechts). Beim Menschen folgt dem AP-Aufstrich (Phase 0) eine kurze Zeit der Repolarisation (Phase 1), der sich die typische Plateauphase (Phase 2) anschließt. Der J-Punkt bildet den Übergang zwischen Phase 1 und 2. Durch den plötzlichen Verschluss der Ca^{2+} -Kanäle kommt es anschließend zur vollständigen Repolarisation (Phase 3), bis das Ruhemembranpotential (Phase 4) wieder erreicht ist. Die prominente Plateauphase fehlt bei der Maus. (Modifiziert nach Nerbonne, 2004, **vgl. auch Kapitel 4.3.2**).

Bei der Maus schließt sich an den QRS-Komplex eine sog. J-Welle (**Abbildung 14**) an, während ein deutliches isoelektrisches ST-Segment fehlen kann und meist nur bei sedierten Tieren als negative Ablenkung sichtbar ist (Liu *et al.*, 2004). Die Erregungsrückbildung stellt sich hier also anders dar, was vermutlich auf Spezies-spezifisch unterschiedlichen Repolarisationsströmen beruht (Liu *et al.*, 2004).

Die J-Welle fällt zeitlich in die frühe Repolarisationsphase und ist daher geeignet, um das Ende der Depolarisation und den Beginn der Repolarisation festzulegen (Liu *et al.*, 2004), was im Zuge der vorliegenden Versuchsreihe die Basis

für die EKG-Auswertung (s.u.) darstellte. Hierfür wurde der Komplex aus J- und T-Welle durch die verwendete Software als *Rodent T-wave* bezeichnet.



Abbildung 14: Vergleich zwischen einem humanen (1) und murinen (2) EKG. Deutlich erkennbar sind die P-Welle (A), der QRS-Komplex (B) und die T-Welle des menschlichen EKGs (C), sowie die J-Welle (D, roter Kreis) hinter dem QRS-Komplex der Maus. (Ausschnitte aus dem Programm *LabChart Pro*-Software).

Im postischämischen EKG von Mensch (Piper, 2012, S.166) und Maus (*Jong et al., 2003*) gilt eine ST-Streckenveränderung als Infarktzeichen. Sie deutet auf eine unvollständige Ventrikeldepolarisation hin und kann als Hebung (aufsteigend) bei einem frischen Infarkt und anschließend als Senkung (absteigend) auftreten. Seinen Ursprung hat dieses Phänomen in der ischämisch geschädigten Verletzungszone, die an das eigentliche Infarktareal angrenzt. Dort kommt es zum Zeitpunkt der Vollerregung oder während der Diastole zu einem Verletzungsstrom, der die im EKG sichtbare Potentialdifferenz verursacht (Piper, 2012, S.166).

Diese Deformierung wurde im vorliegenden Projekt als sicheres Zeichen eines experimentell ausgelösten Infarkts bewertet.

2.5.2 Aufbau der Messeinheit

Die Ableitung eines telemetrischen EKGs an der sich frei bewegenden Maus innerhalb ihres natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus wurde unter Verwendung eines kommerziellen Transmittersystems durchgeführt (**Abbildung 15**). Der Käfig der Maus wird dabei auf eine Ableitungsplatte gestellt. Die beiden Elektrodenenden, die subkutan im Bereich von Herzspitze und –basis liegen und mit dem ebenfalls subkutan implantierten 1,6g schweren Transmitter verbunden sind, registrieren und verstärken elektrische Potentialveränderungen des Mäuseherzens. Diese werden in Radiofrequenzsignale konvertiert und an eine Empfänger-Platte (*DSI PhysioTel Receiver RPC-1*) gesendet. Die Platte ist wiederum an eine Schalt-Matrix (*Power-Lab 8/35*) angeschlossen, die das Signal digital filtert und an einen ebenfalls mit dem System verbundenen Computer weiterleitet. Dieser akquiriert und speichert die Daten automatisch, außerdem wird das laufende EKG optisch sichtbar und dessen Fortlauf kann beobachtet und überprüft werden:



Abbildung 15: Aufbau der Messeinheit. Der Tierkäfig auf der Ableitungsplatte (links), daneben das Power-Lab (unteres Gerät in der Mitte) und der daran angeschlossene PC (rechts).

2.5.3 Implantation von EKG-Transmittern

Für die Implantation der Telemetrie-Transmitter (**Abbildung 16**) wurden adulte Mäuse (mindestens 10 Wochen alt) verwendet. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit einer intraperitonealen Mischinjektion (100 mg/kg KGW Ketamin und 10mg/kg KGW Xylazin). Nach Prüfung der ausreichenden Anästhesie wurde das OP-Feld rasiert (Kaudales Abdomen bis zum Sternum sowie Axillarbereich) und desinfiziert.

Das Tier wurde auf einer beheizten OP-Platte (37°C) mit Hilfe von Klebestreifen in Rückenlage fixiert und zur Narkoseerhaltung über eine Atemmaske mit einem Sauerstoff-Isoflurangemisch (FiO₂ 40%, 2Vol% Isofluran) begast.

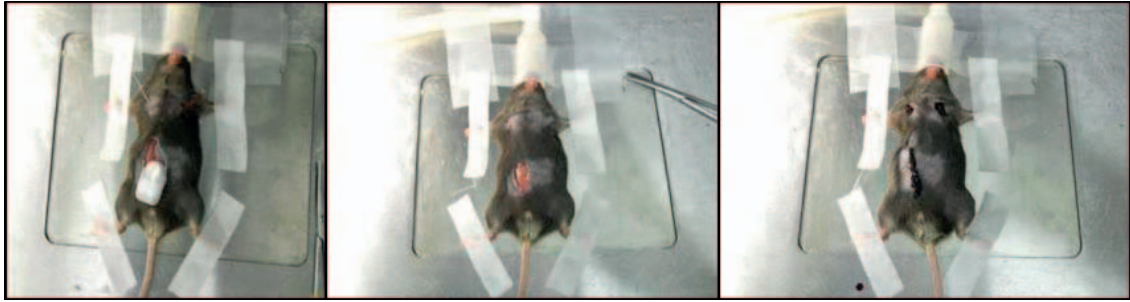


Abbildung 16: Fotografische Demonstration der Transmitter-Implantation: Spätere Position des Transmitters und der Elektroden an dem bereits anästhesierten Versuchstier (links), der Schnittführung für die Implantation (Mitte) und Wundnähte nach Implantation (rechts).

Für die Implantation erfolgte ein 1,5cm langer Hautschnitt paramedian im Bereich des kaudalen Abdomens. Anschließend wurde durch stumpfe Präparation eine kleine Hauttasche geschaffen, in die der Transmitter so platziert wurde, dass die Elektroden nach kranial zeigten. Der Transmitter wurde mit Hilfe eines Einzelheftes mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (*PROLENE 7-0*) um die Elektroden herum am Bauchmuskel fixiert und der Hautschnitt durch mehrere Einzelhefte mit ebenfalls nicht resorbierbarem Faden (*PROLENE 5-0*) verschlossen.

Die beiden Elektrodenenden wurden nach stumpfer Untertunnelung mit einem Trokar subkutan in Richtung der Axillarregion vorgeschoben. Im Bereich von Herzspitze (rote Elektrode) und Herzbasis (weiße Elektrode) wurde jeweils eine kleine Hautinzision (2mm Schnittlänge) gesetzt und dann die Elektrodenenden mit Hilfe von Einzelheften mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (*PROLENE 7-0*) an der Brustmuskulatur fixiert. (Die daraus entstehende Ableitung entspricht in etwa der Ableitung II eines Oberflächen-EKGs). Anschließend erfolgte auch hier der Hautverschluss mit Einzelheften und bei Bedarf zusätzlich mit Metallklammern. Der operative Eingriff dauerte insgesamt 20-30min.

Die Operationsnarben wurden zum Schluss erneut desinfiziert. Zur Unterstützung der Thermoregulation wurden die Käfige der Tiere in den ersten 2h *post operationem* unter eine Wärmelampe gestellt. Wasser und Futter *ad libitum* wurden umgehend angeboten. Außerdem erhielt jedes Tier Buprenorphin (0,05-0,1mg/kg KGW, s.c.) zur Analgesie.

Im Rahmen der Nachsorge erhielten alle operierten Tiere über einen Zeitraum von 5-6 Tagen alle 6-8h Buprenorphin (0,05-0,1mg/kg KGW, s.c.) zur Schmerzstillung. Die Aufzeichnung der Baseline-EKGs erfolgte erst nach vollständigem Abklingen der Anästhetika-Wirkung, 10 Tage nach der Transmitter-Implantation.

2.5.4 Aufzeichnung der 24h-EKGs

Für die prä- und postischämische EKG-Ableitung wurde die gesamte Messeinheit im Tierhaltungsraum des kardiologischen Labors des UKD platziert und jeweils ein Tierkäfig auf eine Ableitungsplatte gestellt. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 24h ein Elektrokardiogramm aufgezeichnet.

2.5.5 Manuelle Grundausswertung der 24h-EKGs

Die Auswertung der EKGs (**Abbildung 17**) erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Mariam Taleb und wurde mit Hilfe der *LabChart Pro*-Software durchgeführt.

Sie fand getrennt nach Tag- und Nachtzyklus statt, um die Aktivitäts- und Ruhephasen der Tiere zu berücksichtigen. Hinsichtlich des Genotyps wurde sie verblindet und von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt.

Die einzelnen EKGs wurden zunächst manuell auf technisch bedingte Artefakte hin durchgesehen und diese exkludiert. Im Zuge dessen wurden darüber hinaus sämtliche Herzrhythmusstörungen (HRS) für die spätere Auswertung markiert.

Anschließend wurde von jedem EKG (prä- und postischämisch) und aus jeder Stunde ein Abschnitt von 20s selektiert. Eine solche Vorauswahl war notwendig, um bei den anschließenden Analysen eine repräsentative Aussage treffen zu können, da viele kleine und nicht exkludierbare Artefakte (z.B. durch ruckartige Bewegungen des Tieres) die automatische Schlagdetektion der Software über das gesamte 24h-EKG überlagerten.

Die resultierenden 48 Abschnitte pro Tier (24 prä- und 24 postischämische) wurden mit bereits analysierten Daten unserer AG zusammengeführt und für die Untersuchung der HRV verwendet.

Die Analyse der Zeiten und Strecken wurde nur basierend auf dem präischämischen EKG und aus jedem zweiten Abschnitt der HRV-Vorauswahl durchgeführt. Daraus ergaben sich 12 Abschnitte, aus denen anschließend jeweils 60 Komplexe analysiert wurden.

Für die HRT-Messung wurden aus den HRS, die im postischämischen EKG aufgetreten waren, zehn Ventrikuläre Extrasystolen (VES) pro Tier ausgewählt.

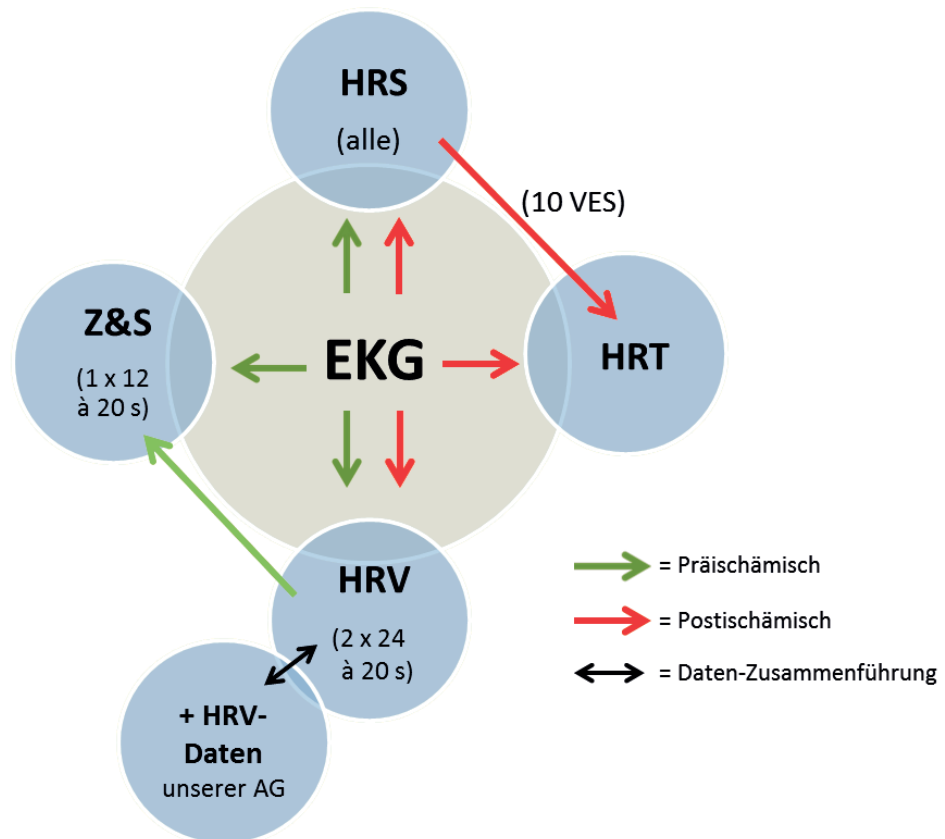


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Analysen pro Tier auf Basis der 24h-EKG-Aufzeichnung. Die Pfeile bezeichnen, aus welchem EKG die Analysen jeweils hervorgingen. Die Zahlen in den Klammern bezeichnen die Anzahl der Abschnitte pro EKG (Z&S = Zeiten und Strecken).

2.5.6 Arrhythmien-Detektion

Für die Erkennung der prä- und postischämisch aufgetretenen Arrhythmien und eventueller Unterschiede zwischen den Genotypen wurden die EKGs aller Versuchstiere manuell durchgesehen. In der vorliegenden Ableitung, die in etwa der Ableitung II nach Einthoven entspricht, konnten die HRS anhand ihrer Morphologie gut detektiert und mittels eines Cursors markiert werden. Dies erleichterte die anschließende Zählung und Auswertung.

2.5.7 Auswertung von Zeiten und Strecken

Um den zeitlichen Verlauf der De- und Repolarisation und etwaige Störungen zu untersuchen und zu überprüfen, ob Panx1 einen Einfluss auf die Zeiten- und Streckenabschnitte des murinen EKGs hat, wurde mit Hilfe der automatisierten *ECG-Analysis*-Funktion der *LabChart Pro*-Software jede zweite der 24 HRV-Sequenzen aus dem präischämischen EKG jedes Versuchstieres genauer ana-

lysiert. Eine postischämische Analyse war nicht möglich, da die Komplexe aufgrund der Ischämie so deformiert waren, dass weder durch die automatische Erkennung der Software noch manuell eine valide Aussage zu treffen war.

Bei der Software-basierten Auswertung werden zunächst im Analysemodul Tierart-bezogene Standards festgelegt (Thierau *et al.*, 2008; Donner *et al.*, 2011):

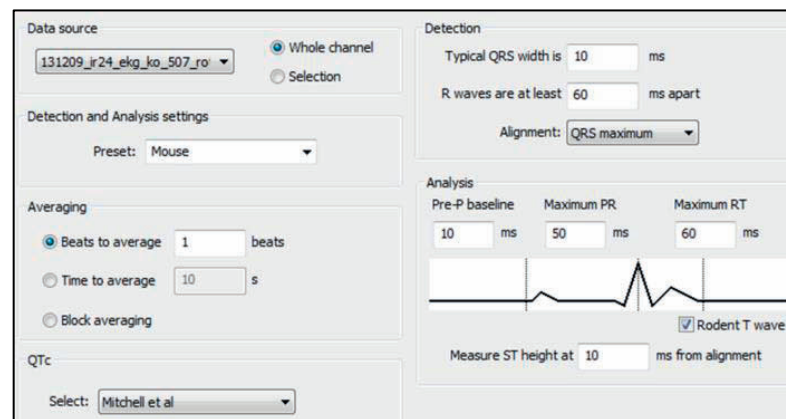


Abbildung 18: Voreinstellungen im Analysemodul *ECG Analysis* von LabChart Pro.

Anhand dieser Voreinstellung berechnet das Programm automatisch den Beginn, den maximalen Ausschlag und das Ende der P-Welle und des QRS-Komplexes sowie den höchsten Punkt der ST-Hebung und das Maximum und Ende der J- und T-Welle (hier als *Rodent T Wave* zusammengefasst, im Folgenden als T-Welle bezeichnet). Die automatische Erkennung des markanten höchsten Punktes der P-Welle und R-Zacke war hierbei sehr zuverlässig, wohingegen das System den Beginn und das Ende der einzelnen Abschnitte, insbesondere das Ende der T-Welle, oft nicht korrekt einordnete (**Abbildung 19**). Um dennoch eine verlässliche Aussage über die atriale und ventrikuläre Depolarisation sowie die Repolarisation treffen zu können, mussten diese Markierungen nachträglich manuell versetzt werden. Dies wurde, basierend auf den Spezies-spezifischen EKG-Eigenschaften (**vgl. Kapitel 2.5.1**) pro Abschnitt bei jeweils 60 Herzaktionen, und somit bei insgesamt 720 Herzschlägen pro Versuchstier, durchgeführt.

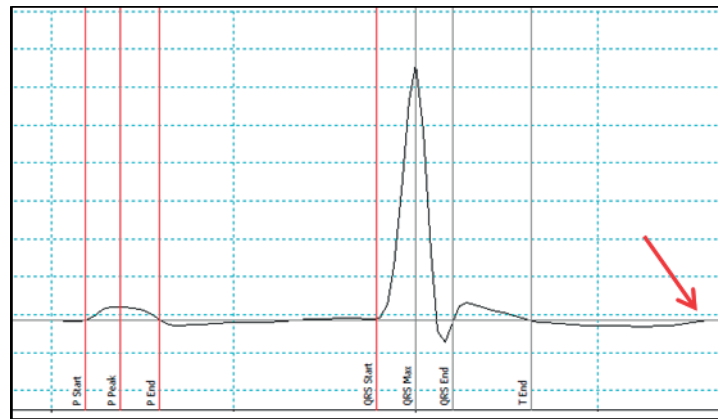


Abbildung 19: Ausschnitt aus dem Analysemodul *ECG Averaging View*. Grau dargestellte Cursor wurden automatisch vom System gesetzt, rote nachträglich manuell korrigiert. Der Cursor für das Ende der T-Welle müsste hier manuell noch weiter nach rechts zum Schnittpunkt der EKG-Linie mit der Nulllinie versetzt werden (roter Pfeil).

Nach der Auswertung der teils automatisch und teils manuell gesetzten Markierungen innerhalb der vorab selektierten EKG-Abschnitte ergaben sich folgende Parameter:

Herzfrequenz (bpm):	Herzschläge/ min
RR-Intervall (ms):	Abstand zwischen zwei R-Zacken
P-Dauer (ms):	Dauer der P-Welle
P-Amplitude (mV):	Scheitelpunkt der P-Welle
PR-Intervall (ms):	Abstand zwischen Beginn der P- Welle und Beginn der R-Zacke
QRS-Intervall (ms):	Abstand zwischen Beginn der Q- und Ende der S-Zacke
R-Amplitude (mV):	Scheitelpunkt der R-Zacke
QT-Zeit (ms):	Abstand zwischen Beginn der Q- Zacke und Ende der T-Welle (Ende des Erregungszyklus)
QT_c-Zeit (ms):	Frequenzkorrigierte QT-Zeit (Korrekturformel nach Mitchell, s.u.)

Da das QT-Intervall mit der Frequenz variiert, ist für eine Vergleichbarkeit dieses Intervalls eine Frequenzkorrektur erforderlich. Diese wurde 1920 von Henry C. Bazett eingeführt (Bazett, 1920) und später, basierend auf der Bazett-Formel, von Gary F. Mitchel für die Maus und deren deutlich höhere Herzfrequenz normiert:

$$QT_c = \frac{QT_0}{\left(\frac{RR_0}{100}\right)^{\frac{1}{2}}}$$

QT_c (ms):	korrigierte QT-Zeit
QT₀ (ms):	gemessene QT-Zeit
RR₀ (ms):	Zykluslänge des beurteilten Herzschlags

Ausgehend von den Werten der QRS-Strecke und der QT-Zeit wurde darüber hinaus auch die sog. JT-Zeit ausgemessen. Die J-Welle ist ein Phänomen der frühen Repolarisation und ermöglicht die genauere Festlegung des Beginns der Reizrückbildungsphase im Mäuseherzen (Liu *et al.*, 2004). Die Formel für die Berechnung der JT-Zeit lautet demnach:

$$QT - QRS = JT - Zeit$$

Die Bestimmung der JT-Zeit macht es möglich, etwaige Reizleitungsstörungen genauer der De- bzw. Repolarisationsphase zuzuordnen.

Sie repräsentiert ausschließlich die Repolarisationsdauer, wodurch etwaige Verlängerungen der Depolarisation, die in die QT-Zeit mit einfließen, ausgeschlossen werden können.

2.5.8 Ermittlung der *Heart Rate Variability*

Die Leistung des Herzens und die stete Anpassung an aktuelle Anforderungen unterliegen der Regulation durch das Autonome Nervensystem (Sympathikus und Parasympathikus). So steigt die Herzfrequenz bei steigender Belastung an und sinkt in Ruhephasen ab. Diese Fähigkeit des gesunden Organismus bezeichnet man als *Heart Rate Variability* (Herzfrequenzvariabilität oder Herzratenvariabilität, HRV). Sympathikus und Parasympathikus wirken hier als Gegenspieler (**Abbildung 20**).

Die Transmitter des Sympathischen Nervensystems sind Noradrenalin und Adrenalin, sie bewirken eine Steigerung der Herzfunktion. Die vagale Aktivierung wird durch die Ausschüttung von Acetylcholin vermittelt, das bei niedrigerer Belastung wieder zu einer Reduktion der Leistungsbereitschaft führt.

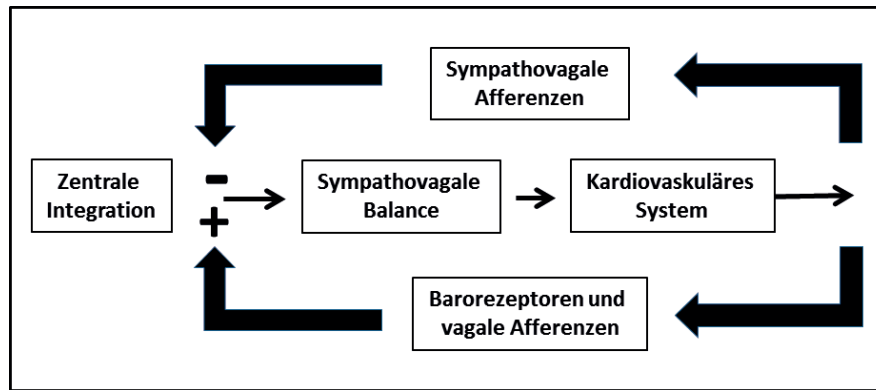


Abbildung 20: Schema des Wechselspiels zwischen Parasympathikus und Sympathikus zur kardiovaskulären Regulation (sympathovagale Balance). Barorezeptoren und vagale Afferenzen aus der kardiopulmonalen Region vermitteln negative Feedbackmechanismen, die zentral integriert werden und zu einer Steigerung der parasympathischen Stimulation sowie einer Inhibition des Sympathikus im kardiovaskulären System führen. Positive Feedback-Mechanismen durch sympathische Afferenzen haben einen gegensätzlichen Effekt. Daraus ergibt sich die sympathovagale Balance (Modifiziert nach Malliani *et al.*, 1992).

Moduliert werden diese sympathischen und parasympathischen Einflüsse weiterhin durch sog. Oszillatoren. Hierbei handelt es sich um zentrale (z.B. durch vasomotorische und respiratorische Zentren) sowie periphere (z.B. durch Schwankungen des arteriellen Blutdrucks und Atembewegungen) „Schwingungserzeuger“ (Malliani *et al.*, 1991), die die Herzfrequenz kurz- oder langfristig verändern können (Malik *et al.*, 1996).

Oft sind derartige Schwankungen der HF extrem geringfügig, weshalb sie weder optisch im EKG sichtbar sind, noch durch die durchschnittliche HF widergespiegelt werden können. Die HRV-Analyse bemisst die Variation der RR-Abstände. Eine geringe Standardabweichung bewirkt eine niedrige HRV. Dabei spielt die Dauer der Messung eine bedeutende Rolle: Werden nur Abschnitte von 2-5min ausgewertet, kann damit bspw. ein akuter kurzzeitiger Abfall der HRV als Antwort auf eine vorübergehende Stresssituation erkannt werden. Im Gegenzug trägt eine Langzeitanalyse, z.B. mit Hilfe eines 24h-EKGs, zur Erfassung langfristiger sympathovagaler Dysbalancen in Form einer reduzierten HRV bei.

Eine reduzierte HRV gilt als Zeichen einer verminderten Anpassungsfähigkeit des Herzens. Daher wird sie bei Menschen, die an verschiedenen Formen von Herzerkrankungen wie bspw. einem Myokardinfarkt (Bigger *et al.*, 1992) leiden, als unabhängiger Indikator kardialer Morbidität und Mortalität angesehen (Thireau *et al.*, 2008).

Um die HRV-Analyse zu vereinfachen und vergleichbare Ergebnisse zu erzie-

len, wurden 1996 Standards für die Messung, die physiologische Interpretation und den klinischen Nutzen beim Menschen veröffentlicht (Malik *et al.*, 1996). Da die Maus als Tiermodell in der kardiovaskulären Forschung eine bedeutende Rolle spielt, wurde die HRV-Analyse in der Vergangenheit vielfach genutzt, bspw. um den kardialen Phänotyp transgener Mäuse zu bestimmen (Gehrmann *et al.*, 2000). Durch die hohe Herzfrequenz und oft auftretende Artefakte erwies es sich als schwierig, die HRV-Analyse auch für diese Spezies zu standardisieren. Daher beschrieben Thireau *et al.* (2008) basierend auf den Empfehlungen für die Analyse beim Menschen (*Task Force*) eine theoretische und praktische Anleitung für die Messung der HRV bei Mäusen (Thireau *et al.*, 2008). Ausgehend von dieser Anleitung wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits eine reduzierte HRV bei *TASK-1*-defizienten Mäusen detektiert (Donner *et al.*, 2011). Auch die folgenden Untersuchungen wurden basierend auf Jerome Thieraus Empfehlungen durchgeführt.

Als Material dienten die bereits zu Anfang der EKG-Analyse selektierten 48 Abschnitte (24 aus dem präischämischen und weitere 24 aus dem postischämischen EKG) à 20s pro Tier (**Abbildung 17**). Die große Zahl der Sequenzen von kurzer Dauer war hier von Vorteil, da das Signal in Mäusen nicht stationär und oft instabil ist und nur mit Hilfe multipler Kurzsequenzen verlässliche Durchschnittswerte erzielt werden können (Malik *et al.*, 1996). Die so selektierten Sequenzen wurden mit bereits analysierten Daten unserer Arbeitsgruppe zusammengeführt und daraus die HRV bestimmt.

Die HRV wird standardmäßig anhand zweier verschiedener Verfahren ermittelt: Zum einen werden die RR-Abstände und deren Abweichung deskriptiv-statistisch innerhalb einer *Time Domain* dargestellt und zum anderen – basierend auf der *Fast Fourier Transformation (FFT)* – innerhalb einer *Frequency Domain* ermittelt.

2.5.8.1 Analyse der *Time Domain*

Bei der Zeitbereichsanalyse werden die normalen RR-Abstände und deren kurzfristige Veränderungen erfasst und Mittelwert, Standardabweichung und weitere Parameter (s.u.) bestimmt. Es gilt: Je geringer die berechneten Zahlenwerte der Standardabweichung der RR-Intervalle sind, desto niedriger die HRV. Zunächst wird festgelegt, welche RR-Intervalle verwendet und welche ausge-

geschlossen werden. Diese Voreinstellung wurde bei der vorliegenden Studie unter Berufung auf eigene vorausgegangene Untersuchungen (24h-EKGs und Belastungs-EKGs) und die dabei ermittelten Grenzen der Herzfrequenzen getroffen:

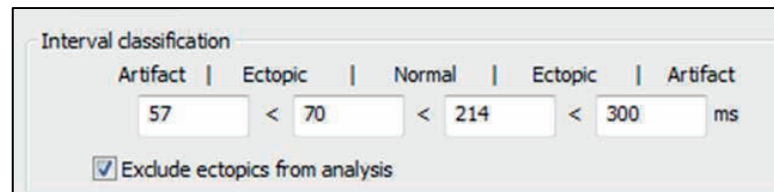


Abbildung 21: In *LabChart Pro* manuell festgelegte Grenzen für die HRV-Analyse in der *Time Domain*-Analysefunktion.

Hieraus ergab sich, dass Herzfrequenzen im Intervall zwischen 70 bis 214ms dem Sinusrhythmus zugeordnet wurden, wohingegen alle Schläge, die in einem geringeren oder höheren Intervall auftraten, als Artefakte und ektope Schläge von der Berechnung exkludiert wurden.

Für eine korrekte Analyse ist darüber hinaus eine verlässliche R-Zacken-Erkennung essentiell. Diese wurde durch die sehr variable Morphologie des EKGs einzelner Tiere (z.B. durch eine unterschiedlich starke Deformierung des QRS-Komplexes nach Ischämie) erschwert. Um dennoch eine exakte Erkennung zu gewährleisten, wurde die R-Zackenerkennung mit Hilfe des Features *R-Wave-Detector* der Software überprüft und ggf. manuell nachbearbeitet (**Abbildung 22**). Im Zuge dieser Analyse wird für jedes EKG-Segment ein elektrischer Schwellenwert (*Threshold*, z.B. 0,25mV) festgelegt. Überschreitet das EKG-Signal diesen Wert, erkennt das System dies automatisch als R-Zacke und setzt einen Eventmarker (blau):



Abbildung 22: Beispiel für die Festlegung des Schwellenwertes zur R-Zacken-detektion in *LabChart Pro*.

Innerhalb der *Time Domain* wurden somit folgende Parameter bestimmt:

Mean NN (ms):	mittleres RR-Intervall
SDNN (ms):	Standardabweichung aller normalen RR-Intervalle einer Messung (Gesamtvariabilität), Marker für die gesamte autonome Variabilität
RMSSD (ms):	Quadratwurzel des quadrierten Mittelwerts der Summe aller Differenzen sukzessiver RR-Intervalle, reflektiert kurzfristige Veränderungen der HF von einem Schlag zum anderen, Indikator der parasympathischen Aktivität
NN6 (%):	Prozentsatz normaler konsekutiver RR-Intervalle, die sich um mehr als 6ms unterscheiden, Surrogat der parasympathischen Herzaktivität (abgeleitet aus dem für Menschen definierten NN50, bei dem 50ms ca. 10% der durchschnittlichen RR-Intervalle entsprechen (Thireau <i>et al.</i> , 2008))

2.5.8.2 Analyse der *Frequency Domain*

Für die Daten-Auswertung im Rahmen der *Frequency Domain* werden drei Frequenzbänder (VLF = *Very Low Frequency*, LF = *Low Frequency*, HF = *High Frequency*) festgelegt (**Abbildung 23**) und die Herzfrequenz anhand ihrer Variabilität in diese drei Frequenzspektren eingeteilt. Die Berechnung der Parameter erfolgt dann mittels Spektralanalyse, die die periodische Oszillation der Herzfrequenz (RR-Abstände) nach Häufigkeit verschiedenen Frequenzspektren und Amplituden zuordnet (Thireau *et al.*, 2008). 1 Hz entspricht dabei 1 Schwingung/ s. Die FFT liefert den hierfür notwendigen mathematischen Algorithmus.

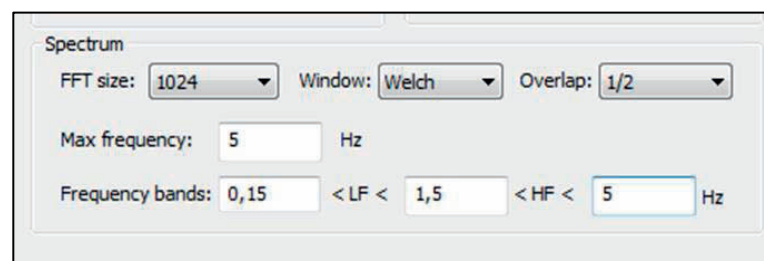


Abbildung 23: Manuelle Voreinstellung der Frequenzbänder in LabChart Pro basierend auf Empfehlungen von Thireau *et al.*, 2008. Herzfrequenzen zwischen 0,0 und 0,15Hz werden dadurch automatisch dem VLF-Band zugeordnet, wohingegen Frequenzen zwischen 0,15 und 1,5Hz in den Bereich des LF-Bandes und solche zwischen 1,5 und 5Hz in den des HF-Bandes eingeteilt werden.

Innerhalb der *Frequency Domain* wurden ausgehend vom Menschen (Malik *et al.*, 1996) folgende Parameter bestimmt:

TP (ms²):	Total Power , definiert die Gesamtfläche unter der Kurve innerhalb aller Frequenzbereiche, quantifiziert dadurch die Gesamtleistung über alle Frequenzbänder. Gilt als Maß für den globalen Einfluss des Autonomen Nervensystems auf das Herz-Kreislaufsystem.
HF (ms²):	High Frequency Band (Hochfrequenz-Band), Bereich zwischen 1,5 und 5Hz, Frequenzen im HF-Band dienen als Maß für die vornehmlich vagal vermittelte Variation der Frequenz, z.B. durch Atmung
LF (ms²):	Low Frequency Band (Niedrigfrequenz-Band), Bereich zwischen 0,15 und 1,5Hz) Frequenzen in diesem Band haben ihren Ursprung sowohl in parasympathischen als auch sympathischen Einflüssen, darüber hinaus repräsentieren sie die Aktivität der Barorezeptoren
VLF (ms²):	Very Low Frequency Band (Niedrigfrequenz-Band), Bereich zwischen 0,0 und 0,15Hz), Frequenzen in diesem Band korrespondieren bis zu 95% mit denen der TP, das physiologische Korrelat ist jedoch unbekannt
LF/HF:	Verhältnis des HF- zum LF-Band , repräsentiert die vegetative Balance zwischen Sympathikus und Parasympathikus, je größer der Quotient, desto mehr sympathische Aktivität

2.5.9 Untersuchung der *Heart Rate Turbulence*

Als *Heart Rate Turbulence* (HRT), 1999 erstmals von Schmidt *et al.*, beschrieben (Schmidt *et al.*, 1999), bezeichnet man kurzzeitige Schwankungen der Länge der Sinuszyklen, die auf eine spontane VES folgen. Sie gilt als Maß für den Barorezeptorreflex, der nach einem Blutdruckabfall, wie er durch eine unvollständige und hämodynamisch ineffiziente Kontraktion im Rahmen einer VES sowie die anschließende kompensatorische Pause hervorgerufen wird, zu einer Gegenregulation durch Sympathikus-Aktivierung führt (Malik *et al.*, 1999).

Die von einem ektopen Zentrum im Ventrikel ausgehende Erregung führt dazu, dass die nächste reguläre Herzerregung durch den Sinusknoten in die absolute Refraktärzeit des Kammermyokards fällt. Dadurch entsteht die kompensatorische Pause. Die hämodynamisch unzureichende Kontraktion des Myokards verursacht eine verminderte Ventrikelfüllung und es kommt zum Blutdruckabfall. Der rasch abfallende Blutdruck fungiert nachfolgend als Trigger für das Auto-

nome Nervensystem: Die Barorezeptoren in der aufsteigenden Aorta und dem Aortenbogen werden weniger gedehnt. Dies bewirkt, dass das kardiovaskuläre Zentrum in der *Medulla oblongata* die vagale afferente Stimulation reduziert und die sympathische Stimulation steigert. Als Folge steigen die Herzfrequenz und der Gefäßwiderstand an und die Herzleistung wird verbessert. Dies führt zur Rückkehr des Blutdrucks auf Normalniveau bis hin zu einem kurzzeitigen *Over-shoot*, also Werten oberhalb des Normalniveaus (auch Malik *et al.*, 1999).

In zahlreichen Studien (u.a. Schmidt *et al.*, 1999; Ghuran *et al.*, 2002; Barthel *et al.*, 2003; Wichterle *et al.*, 2004) wurde gezeigt, dass die HRT bei Patienten, die einen myokardialen Infarkt erlitten haben, reduziert ist oder vollständig fehlt. Dadurch hat sie klinisch, insbesondere aufgrund der Unabhängigkeit von anderen Risiko-Markern (z.B. LVEF), prognostische Relevanz erlangt (Barthel *et al.*, 2003).

Da die HRT beim Auftreten einzelner VES häufig durch eine HRV anderen Ursprungs überlagert wird (Bauer *et al.*, 2008), müssen, um eine korrekte Analyse des HRT-Musters durchführen zu können, mehrere VES aus einem 24h-EKG selektiert und die berechneten Werte gemittelt werden (Bauer *et al.*, 2008).

Im vorliegenden Projekt wurden aus dem postischämischen 24h-EKG eines jeden Versuchstieres zehn VES selektiert und hinsichtlich einer Veränderung der HRT nach Ischämie und Unterschieden zwischen den Genotypen analysiert.

2.5.9.1 *Turbulence Onset* und *Turbulence Slope*

Für die Berechnung der HRT wird die initiale Phase nach einer VES, also die des Blutdruckabfalls und kompensatorischen Herzfrequenzanstiegs (*Early Acceleration*), mit dem Parameter *Turbulence Onset* (TO) bezeichnet. Die späte Phase der HRT, in der Blutdruck und Herzfrequenz sich allmählich wieder normalisieren, bezeichnet man als *Turbulence Slope* (TS).

Der TO entspricht der prozentualen Veränderung der RR-Intervalle nach der VES in Bezug auf die Länge der RR-Intervalle vor der VES. Bestimmt wird er anhand folgender Formel:

$$TO \text{ (in \%)} = \frac{[(RR_1 + RR_2) - (RR_{-2} + RR_{-1})]}{RR_{-2} + RR_{-1}} \times 100$$

Hierbei bezeichnen RR_{-2} und RR_{-1} die beiden letzten Normalintervalle vor der VES und RR_1 und RR_2 die beiden ersten Normalintervalle nach der kompensatorischen Pause. Das Intervall zwischen RR_{-1} und der VES bezeichnet man als Kopplungsintervall (**Abbildung 24**). Um die Intervalle zu bestimmen, wird der maximale Ausschlag der R-Zacke als Referenzpunkt genutzt:

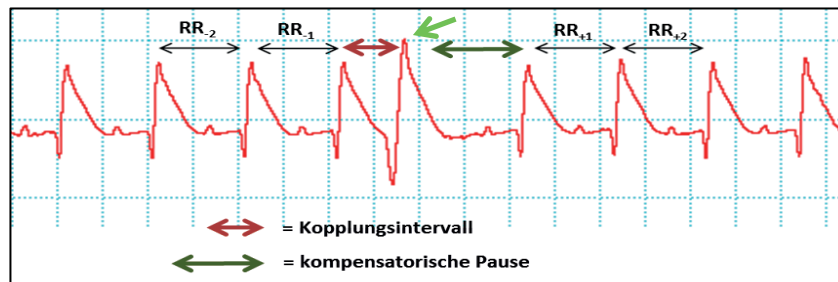


Abbildung 24: Bezeichnung der Intervalle um eine Ventrikuläre Extrasystole. Der frühzeitig eintreffenden VES aus einem ektopen Zentrum (hellgrüner Pfeil) geht ein Kopplungsintervall voraus. Anschließend folgt eine kompensatorische Pause. Die beiden Normalintervalle vor (RR_{-1} , RR_{-2}) und nach (RR_1 , RR_2) der VES werden für die Berechnung des TO verwendet.

Ein *Turbulence Onset* $< 0\%$ bedeutet somit eine Beschleunigung des Sinusrhythmus und gilt sowohl beim Menschen (u.a. Schmidt *et al.*, 1999; Barthel *et al.*, 2003) als auch bei der Maus (Mersmann *et al.*, 2010) als physiologisch, wohingegen Werte $> 0\%$ eine Verlangsamung bedeuten und als pathologisch bewertet werden.

Der TS berechnet sich aus der steilsten Regressionsgeraden fünf aufeinander folgender RR-Intervalle innerhalb der ersten 15 Sinusintervalle nach der kompensatorischen Pause. Da die Standardwerte des *Turbulence Slope* für den Menschen gelten, muss jedes RR-Intervall (RR_x) der Maus vor der Berechnung des TS nach folgender Formel umgerechnet werden:

$$RR_n = \frac{RR_x}{\left(\frac{RR_{-2} + RR_{-1}}{2 \times 800ms}\right)}$$

RR_n : Normiertes RR-Intervall

RR_{-1} , RR_{-2} : Die beiden letzten Normalintervalle vor der VES

Auf diese Weise ist es möglich, die Herzfrequenzen der Tiere, entsprechend einem RR-Intervall von 800ms, auf die menschliche Standardfrequenz von 75min^{-1} zu normieren.

Aus den 15 konsekutiven RR-Intervallen einer VES (RR_n) erhält man 11 mögliche Regressionsgeraden (Intervall 1-5, 2-6, 3-7, 4-8, 5-9, 6-10, 7-11, 8-12, 9-13, 10-14 und 12-15). Mit *Excel* werden anschließend die Steigungen aller Geraden berechnet und der höchste, der entsprechend den TS beschreibt, bewertet. Angegeben wird der *Turbulence Slope* in ms/RR-Intervall (ms/RRi). Zeigt die Maus einen positiven Wert, gilt dies als physiologisch und entspricht einer Zunahme der RR-Intervalldauer und damit Verlangsamung der HF in der späten Phase nach einer VES (Bauer *et al.*, 2008).

2.6 Invasive LV-Funktionsanalyse mittels Druck-Volumen-Katheter

2.6.1 Durchführung

Diese wurde in Zusammenarbeit mit Frau VMTA Stefanie Becher durchgeführt. Die simultane invasive Messung der Druckverhältnisse in der Aorta und dem Herzen mit Hilfe eines Druck-Volumen-Katheters (sog. Millar-Katheter oder Mikro-Tip-Katheter) gilt sowohl in der Klinik als auch in der Grundlagenforschung als Goldstandard für die Messung der kardiovaskulären Dynamik und die Untersuchung der Herzphysiologie (Georgapoulos *et al.*, 1998).

Der verwendete Katheter kann in ein Gefäß eingeführt werden und ist am distalen Ende mit einem Ultra-Miniatur-Drucksensor ausgestattet, der ein elektrisches Ausgangssignal erzeugt, das sich proportional zur Größe des wahrgenommenen Drucks verändert (Millar Instruments, Inc., 2008). Er dient also als Druckumwandler, der so hohe Frequenzen (bis 10kHz) erfasst, dass trotz der extrem hohen Herzfrequenz der Blutdruck von Mäusen gemessen werden kann (Lorenz *et al.*, 1997). Die so entstandenen Daten werden auf einen angeschlossenen Computer übertragen, wo sie mittels der Software *iox 2.0* graphisch als Druckkurve und als Druckwert visualisiert und digital gespeichert werden. Die Analyse wurde unmittelbar vor der finalen Herzentnahme nach einem von Pacher *et al.* im Jahr 2008 empfohlenen Protokoll durchgeführt (Pacher *et al.*, 2008).

Zur Vorbereitung wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Mischinjektion (100 mg/kg KGW Ketamin und 10 mg/kg KGW Xylazin) anästhesiert und in Rückenlage auf einer Wärmeplatte (37°C) fixiert (**Abbildung 25**).

Unter Verwendung eines Operationsmikroskops folgte ein Hautschnitt rechtslateral am Hals auf Höhe des Kehlkopfes (ca. 1,5cm Schnittlänge) sowie die stumpfe Präparation und Darstellung der *A. carotis communis* (Halsschlagader) unter behutsamer Schonung der Schilddrüse, umliegender Gefäße und Nerven (insbesondere des *N. vagus*).

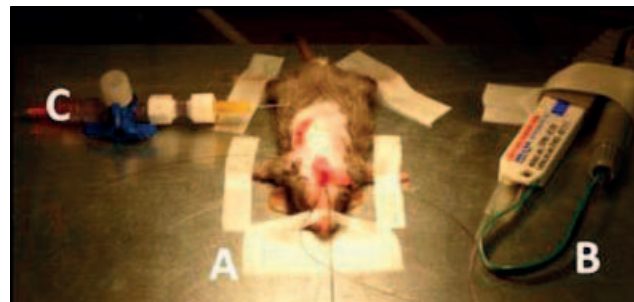


Abbildung 25: Photographische Darstellung der Millar-Katheter-Untersuchung mit A) Positionierung des Versuchstieres in Rückenlage für den Zugang zur *A. carotis communis*, B) Druck-Volumen-Katheter, C) Perfusor, über den im Laufe der Untersuchung intraperitoneal NA zugeleitet werden kann.

Danach wurde kaudal der *Bifurcatio carotidis* die *A. carotis communis* mit einem *SERAFLEX*-Faden (5-0) ligiert. Etwa 1cm kaudal davon wurde eine Gefäßklemme positioniert. Es folgte die vorsichtige Inzision der Gefäßwand im Bereich der zuvor durch Gefäßklemme und Ligatur von der Blutzirkulation abgetrennten Gefäßstelle und das Einführen des Druck-Volumen-Katheters in die *A. carotis communis* (**Abbildung 26**).

Die Gefäßklemme wurde umgehend geöffnet und der Katheter unter Aufzeichnung der Druckkurve weiter in die Aorta vorgeschoben und fixiert (**Abbildung 27**). Es folgte die Aufzeichnung des P_{\max} und des P_{\min} in der Aorta als Parameter für den systolischen bzw. diastolischen Blutdruck über einen Zeitraum von 1min.

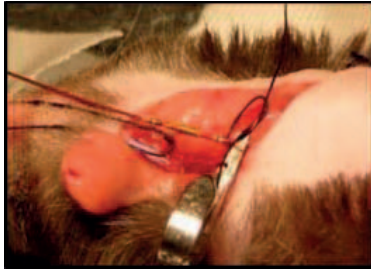


Abbildung 26: Der Druck-Volumen-Katheter am Tier unmittelbar vor der Öffnung der Gefäßklemme und dem Verschieben in die *A. carotis communis*.

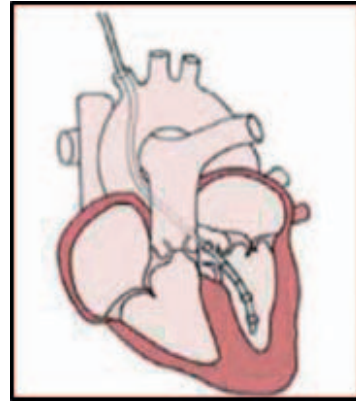


Abbildung 27: Positionierung des Druck-Volumen-Katheters im linken Ventrikel (Darstellung aus Pacher *et al.*, 2008).

Anschließend wurde der Katheter vorsichtig über die Aortenklappe in den linken Ventrikel vorgeschoben, erneut fixiert und die Wertaufzeichnung über den Zeitraum von 1min fortgesetzt. Von Bedeutung waren dabei vor allem folgende Parameter:

dP/dt_{\max} (mmHg/s): maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit der Herzmuskulatur

dP/dt_{\min} (mmHg/s): maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit der Herzmuskulatur

PES (mmHg): endsystolischer Druck im linken Ventrikel

PED (mmHg): enddiastolischer Druck im linken Ventrikel

HF (bpm): Herzschläge/min

Bei dP/dt_{\max} und dP/dt_{\min} handelt es sich um den Differentialquotient von Druck (p) nach Zeit (t). Abschließend wurde eine an einen Perfusor angeschlossene Injektionsnadel im Bereich des kaudalen Abdomens intraperitoneal eingestochen und über einen Zeitraum von 12min kontinuierlich Noradrenalin ($0,04\mu\text{g/g KGW/min}$) appliziert. Auch über diesen Zeitraum wurden die Druckwerte im linken Ventrikel weiter aufgezeichnet.

2.6.2 Auswertung

Die mit Hilfe der Software *iox 2.0* digital gespeicherten Druckwerte wurden zunächst in *Excel 2010* und dann in das Statistikprogramm *GraphPad Prism* Version 5.02 übertragen und ausgewertet.

2.7 Paraffineinbettung für die histologische Untersuchung

Diese Methode wurde in Zusammenarbeit mit der Biologielaborantin (BTA) Frau Sonja Green in der ZETT der HHU durchgeführt. Die mikroskopische Untersuchung fand in Zusammenarbeit mit der Biologin Frau Gesine Weber im kardiologischen Labor des UKD statt.

2.7.1 Vorbereitung für die Einbettung

Zur Vorbereitung für die Einbettung wurden jeweils 2 *Panx1*^{+/+}- und *Panx1*^{-/-}-Tiere mittels CO₂-Begasung (100% Kohlendioxid) getötet und die Herzen umgehend entnommen. Diese wurden anschließend in 4%igem Formaldehyd fixiert. Nach zwei Tagen wurde das Formaldehyd abgegossen, die Herzen in Einbettkassetten übertragen und in *A. dest.* (destilliertes Wasser) gewässert sowie zusätzlich 1h unter fließendem Leitungswasser abgespült, um das restliche Formalin zu entfernen.

Dann erfolgte über einen Zeitraum von 12h die Entziehung aller Gewebsflüssigkeit in einem Einbettautomaten. Dabei wird die Flüssigkeit zunächst durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 99,5%) entwässert und der Alkohol anschließend durch ein Intermedium (Xylol-Ersatz) ausgetauscht. Dies ist von großer Wichtigkeit, da Paraffin weder wasser-, noch alkohollöslich ist und nur das Intermedium sich mit dem Paraffin verbinden kann.

Nach der Entwässerung wurden die Einbettkassetten in einer Ausgießstation in flüssiges Paraffin (65°C) gelegt, bis dieses die Herzen durchdrungen hatte. Im Anschluss wurden sie in einem Gießschälchen mit heißem Paraffin überschichtet, auf einer Kälteplatte abgekühlt und mit dem Deckel der Einbettkassette als Abdeckung versehen. Die Ausgießform konnte schließlich von dem erkalteten Paraffinblock entfernt werden.

2.7.2 Anfertigung der histologischen Schnitte

Für die Schnitterstellung wurde jeder einzelne Paraffinblock in einem Rotationsmikrotom fixiert und Schnitte in einer Dicke von 3µm angefertigt. Jeder Schnitt wurde umgehend in ein 35°C warmes Wasserbad (1250ml A. dest. und 12,5ml Haftmittel für Gewebeschnitte) übertragen und dann auf einen beschrifteten Objektträger aufgezogen (**Abbildung 28**). Das Haftmittel bewirkt, dass sich der Schnitt besser mit dem Objektträger verbindet. Danach wurden die Schnitte in einem Küvetteneinsatz getrocknet und aufbewahrt.

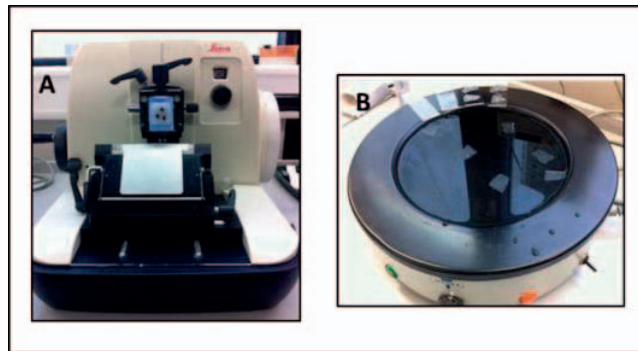


Abbildung 28: Fotografische Darstellung von A) Rotationsmikrotom mit eingespanntem Paraffinblock und B) Wasserbad mit darin enthaltenen Schnitten.

2.7.3 Färbung der histologischen Schnitte

Zur besseren Darstellung der anatomischen Strukturen wurden die Paraffinschnitte mittels HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) nach standardisiertem Protokoll angefärbt und dann mit einem speziellen Filterpapier getrocknet. Damit das Deckglas fest dem Objekt anhaftet und dieses geschützt ist, wurde ein Eindeckmedium aufgetragen und dann das Deckglas darauf platziert. Nach erneutem Trocknen konnten die Präparate schließlich mikroskopisch untersucht werden.

2.7.4 Mikroskopie der histologischen Schnitte

Alle Präparate wurden lichtmikroskopisch untersucht und nach Qualität selektiert. Verwendbare Schnitte wurden abfotografiert, mittels *Leica Application Suite-Software* bearbeitet und schließlich auf einem an das Mikroskop angeschlossenen PC gespeichert.

2.8 Statistische Auswertung

Die Auswertung aller Versuchsergebnisse wurde mit der Software *GraphPad Prism* Version 5.02 durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) der jeweils angegebenen Anzahl an Versuchstieren. Als statistische Testverfahren wurden der ungepaarte bzw. gepaarte parametrische t-Test sowie der nicht-parametrische U-Test nach Mann und Whitney angewendet.

Ein p-Wert $> 0,05$ wurde als statistisch nicht signifikanter (n.s.) Unterschied gekennzeichnet. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikanter (*) Unterschied zwischen den Messgrößen betrachtet. Als zusätzliche Signifikanzniveaus wurden ein p-Wert $< 0,01$ (**) und ein p-Wert $< 0,001$ (***) verwendet.

2.9 Materiallisten

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Materialien für die Zucht und Genotypisierungen

Gerät/ Material	Hersteller
Futtermittel für Mäuse <i>ssniff M-Z</i> , Ø 15mm <i>ssniff R/M-H</i> , Ø 15mm	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Tiefkühlschrank (<i>Hera freeze</i> , 78°C)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Tiefkühlschrank (-24°C)	Vaust GbR, Weilmünster, Deutschland
Thermocycler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Spin Columns</i> (<i>QIAprep Spin Miniprep Columns</i>) Auffanggefäße (<i>Collection Tubes</i>)	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Zentrifuge (<i>Multifuge 3 S-R</i>)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Spektralphotometer (<i>NanoDrop1000</i>)	Nanodrop Products, Wilmington, USA
PCR-Maschine (<i>TPersonal 20 Thermal Cycler</i>)	LABREPCO, Horsham, USA

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien für die Genotypisierungen

Chemikalie	Hersteller
<i>QIAGEN DNeasy Blood and Tissue Kit</i> <i>ATL-Puffer</i> <i>AL-Puffer</i> <i>AW1-Puffer</i> <i>AW2-Puffer</i> <i>AE-Puffer</i> <i>Proteinase K</i>	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Ethanol	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Polymerase: <i>Red Taq DNA Polymerase</i>	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Ethidiumbromid	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Primer: Geno Pxn1 (wtgin3 – 5' to 3') GGAAAGTCAACAGAGGTACCC Geno Pxn2 (wtex15 – 5' to 3') GGCCACGGAGTATGTGTT Geno Pxn3 (lacseq12 – 5' to 3') GTCCCTCTCACCACCTTTTCTTACC	
Agarose	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland
TRIS-Borat-EDTA-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Bandenmarker (<i>DNA Ladder</i> , Markierung alle 100BP)	Invitrogen, life TechnologiesTM, Carlsbad, USA

Tabelle 4: Verwendete Geräte und Materialien für die Ischämie und Reperfusion

Gerät	Hersteller
Rasierklinge	Wilkinson Sword GmbH, Solingen, Deutschland
Venenverweilkanüle (<i>Vasofix Safety 20G</i>)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Intubationsständer (<i>UNO BV</i>)	Zevenaar, Niederlande
Lichtquelle (<i>KL 1500 LCD</i>) Operationsmikroskop (<i>MS5</i>)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Beheizter Operationstisch für Kleintiere	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Operationsschere, gerade (10,5cm) Sprungschere, gebogen (8,5cm) Magnethalter (<i>Blunt Retractors, Wirehandles und Short Fixators</i>) Hautschere	FST GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mikropinzette (Uhrmachermodell), gebogen (115mm)	Aesculap Suhl GmbH, Suhl, Deutschland

Chirurgische Fäden:	
<i>PROLENE 7-0</i>	Ethicon, Johnson&Johnson GmbH, Norderstedt, Deutschland
<i>PERMA-HAND Seide 4-0</i>	
<i>PROLENE 5-0</i>	
Polyethylen-Schlauch (<i>Intramedic Polyethylene Tubing PE-10</i>)	BD, Heidelberg, Deutschland
Wärmelampe (Rotlichtlampe)	Beurer, Ulm, Deutschland

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Medikamente für die Ischämie und Reperfusion

Chemikalie/ Medikament	Hersteller
Ketamin (<i>Ketanest S</i>)	Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland
Xylazin (<i>Rompun 2%</i>)	Bayer, Leverkusen, Germany
Isofluran (<i>Forene</i>)	Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, Deutschland
Haarentfernungscreme (<i>Veet</i>) Buprenorphinhydrochlorid (<i>Temgesic</i>)	Reckitt Benckiser Deutschland GmbH, Heidelberg, Deutschland
Desinfektionsspray (<i>Octenisept</i>)	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
NaCl 0,9%	B. Braun Melsungen AG

Tabelle 6: Verwendete Geräte und Materialien für die Evan`s Blue- und TTC-Färbung sowie die Infarktplanimetrie

Gerät	Hersteller
Operationsmikroskop (<i>SMZ645</i>)	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Mikropinzette	FST GmbH, Heidelberg, Deutschland
Aortenkanüle	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Tiefkühlschrank (-20°C)	Vaust GbR, Weilmünster, Deutschland
Seidenfaden (<i>SERAFLEX 5-0</i>)	Serag-Wiessner GmbH & Co KG, Naila, Deutschland

Rasierklinge	Wilkinson Sword GmbH, Solingen, Deutschland
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Stereomikroskop (MZ9.5)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Kamera (Hitachi HV-C20AMP)	Hitachi Kokusai Electric Europe GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
DISKUS Software	Hilgers Technisches Büro, Königswinter, Deutschland

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Medikamente für die Evan`s Blue- und TTC-Färbung sowie die Infarktplanimetrie

Chemikalie/ Medikament	Hersteller
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Serag-Wiessner GmbH&Co. KG, Naila, Deutschland
NaCl 0,9%	B. Braun Melsungen GmbH
<i>Evans Blue</i> (Farbstoff)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karsruhe, Deutschland

Tabelle 8: Verwendete Geräte und Materialien für die EKG-Aufzeichnung

Gerät	Hersteller
Transmitter EKG-Transmitter (Modell <i>ETA F-10</i>)	Data Sciences International (DSI), Minneapolis
Ableitungsplatte (<i>DSI PhysioTel Receiver RPC-1</i>)	
Magnet zur Aktivierung	
Analog-Digital-Umwandler (Power-Lab 8/35) Analysesoftware (<i>LabChart Pro 7</i>)	ADInstruments Ltd, Oxford, UK

Detergenzien zur Reinigung und Sterilisation der Transmitter:	
Enzymatischer Reiniger (gigazyme)	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Formaldehydfreie Spezialdesinfektion (gigasept)	
Operationsschere, gerade (10,5cm)	FST GmbH, Heidelberg, Deutschland
Sprungschere, gebogen (8,5cm)	
Mikropinzetten	
Trokar	
Hautschere	
Chirurgische Fäden: <i>PROLENE 7-0</i> <i>PROLENE 5-0</i>	Ethicon, Johnson&Johnson GmbH, Norderstedt, Deutschland
Metallklammern (<i>Perfect Agrafes Chirurgicales</i>)	FST GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wärmelampe (Rotlichtlampe)	Beurer, Ulm, Deutschland

Tabelle 9: Verwendete Geräte und Materialien für die Echokardiographie

Gerät	Hersteller
Ultraschallgerät und Analysesoftware (Vevo <i>2100 Imaging system</i>) Ultraschallkopf (<i>MS400</i>)	VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Canada
Rasierklinge	Wilkinson Sword GmbH

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien und Medikamente für die Echokardiographie

Chemikalie/ Medikament	Hersteller
Ketamim (<i>Ketanest S</i>)	Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland
Xylazin (<i>Rompun 2%</i>)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Desinfektionsspray (<i>Octenisept</i>)	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Isofluran (<i>Forene</i>)	Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, Deutschland

Buprenorphinhydrochlorid (<i>Temgesic</i>)	Reckitt Benckiser Deutschland GmbH, Heidelberg, Deutschland
---	--

Tabelle 11: Verwendete Geräte und Materialien für die Katheter-Untersuchung

Gerät	Hersteller
Mikro-Tip-Katheter-Drucksensor (<i>SPR-839</i>)	Millar Instruments, Inc., Houston, USA
Auswertungssoftware (<i>iox 2.0</i>)	emka Technologies S.A., Paris, Frankreich
Beheizter Operationstisch für Kleintiere	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Lichtquelle (<i>KL 1500 LCD</i>) Operationsmikroskop (<i>MS5</i>)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Sprungschere, gebogen (8,5cm) Hautschere Gefäßclip (<i>Micro Serrefines</i>)	FST GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mikropinzette (Uhrmachermodell), gebogen (115mm)	Aesculap Suhl GmbH, Suhl, Deutschland
Perfusor (<i>Precidor HT</i>)	Infors AG, Basel ,Schweiz
Seidenfaden (<i>SERAFLEX 5-0</i>)	Serag-Wiessner GmbH&Co. KG

Tabelle 12: Verwendete Chemikalien und Medikamente für die Katheter-Untersuchung

Chemikalie/ Medikament	Hersteller
Ketamin (<i>Ketanest S</i>)	Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland
Xylazin (<i>Rompun 2%</i>)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Noradrenalin (<i>Arterenol</i>)	Sanofi-Aventis GmbH, Berlin, Deutschland

Tabelle 13: Verwendete Geräte und Materialien für die Paraffineinbettungen

Gerät	Hersteller
Gewebe-Einbettkassetten	Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland
Einbettautomat (<i>Tissue Tek VIP5Jr., Vacuum Infiltr.Proc.</i>)	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande

Ausgießstation (<i>Modell EG1150H</i>) Kälteplatte (<i>Modell EG1150C</i>)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Paraffinsteckbad, rund (<i>Typ 25900</i>)	MEDAX GmbH & Co KG, Neumünster, Deutschland
Lichtmikroskop (<i>Modell R DM4000 M</i>) Rotationsmikrotom (<i>Modell M2135</i>) Mikroskop-Kamera (<i>Modell DFC425 C</i>) Software (<i>Leica Application Suite LAS V3.7</i>)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Objektträger mit Mattrand	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Deckgläschen	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Filterpapier	Vogel GmbH & Co. KG, Essen, Deutschland

Tabelle 14: Verwendete Chemikalien für die Paraffineinbettungen

Chemikalie	Hersteller
Formalin 4% (<i>Roti Histofix</i>) <i>Ethanol</i> $\geq 99,5\%$ Intermedium (<i>Roti-Histol</i>)	Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraffin Pastillen für die Histologie	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Haftmittel (<i>Q Path Stick On</i>)	Labonord S.A.S., Templemars, Frankreich
Mayer's Hematoxylin	VWR International, Leuven, Belgien
Eosin G	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eindeckmedium (<i>Tissue-Mount</i>)	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande

Tabelle 15: Verwendete Software für die statistische Auswertung

Software	Hersteller
<i>Microsoft Office Excel</i> 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
<i>GraphPad Prism</i> Version 5.02	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA

3 Ergebnisse

3.1 Tierdaten

Insgesamt wurden 22 Tiere in das Projekt eingeschlossen. Ein Tier musste nachträglich wegen anatomischer Anomalien ausgeschlossen werden und drei weitere verstarben während der Versuchsreihe. So konnten die Messdaten von 18 Tieren für die Auswertung verwendet werden.

Tabelle 16: Anzahl der Tiere in den einzelnen Methoden jeder Versuchsreihe.

Methode	Anzahl der Tiere	
	Präischämisch	Postischämisch
Arrhythmien	18 (8 WT, 10 KO)	15 (6 WT, 9 KO)
Zeiten und Strecken	18 (8 WT, 10 KO)	Keine Analyse
HRV-Analyse	18 (8 WT, 10 KO)	18 (8 WT, 10 KO)
HRT-Analyse	Keine Analyse	14 (6 WT, 8 KO)
Echokardiographie	18 (8 WT, 10 KO)	16 (6 WT, 10 KO)
Millar-Katheter	Keine Analyse	16 (7 WT, 9 KO)
Infarktplanimetrie	Keine Analyse	17 (7 WT, 10 KO)
Paraffineinbettungen	4 (2 WT, 2 KO)	Keine Analyse

3.2 Ergebnisse der EKG-Auswertung

3.2.1 Ergebnisse der Arrhythmien-Detektion

Nach der telemetrischen Aufzeichnung der EKGs wurden diese zunächst auf Artefakte und Herzrhythmusstörungen hin durchgesehen, artefaktreiche Bereiche exkludiert und Pathologien markiert. Präischämisch waren alle EKGs der 18 Versuchstiere (acht *Panx1*^{+/+}- und zehn *Panx1*^{-/-}-Mäuse) technisch von guter Qualität und konnten folglich für die Analyse verwendet werden. Postischämisch wurden die EKGs von 15 Tieren (sechs *Panx1*^{+/+}- und neun *Panx1*^{-/-}-Mäuse) mit einbezogen. Die postischämischen EKGs der drei weiteren Tiere waren durch Bewegungsartefakte für eine valide Auswertung nicht mehr verwendbar.

Hauptziel der Auswertung war es, ST-Streckenveränderungen und das Auftreten von Arrhythmien vor und nach Ischämie zu detektieren und Unterschiede zwischen den Genotypen aufzuzeigen.

Präischämisch zeigten alle Versuchstiere Herzrhythmusstörungen (**Abbildung 29**). Sinuatriale Blockierungen konnten bei jeweils einer *Panx1^{+/+}*- und einer *Panx1^{-/-}*-Maus festgestellt werden. Atrioventrikuläre Blockierungen (AV-Blöcke) traten bei allen Tieren auf. Bei sieben *Panx1^{+/+}*- und acht *Panx1^{-/-}*-Tieren wiesen die präischämisch aufgezeichneten EKGs VES auf. Vereinzelt wurden Couplets (bei vier *Panx1^{+/+}*- und fünf *Panx1^{-/-}*-Tieren) und Triplets (bei einem *Panx1^{+/+}*- und einem *Panx1^{-/-}*-Tier) beobachtet.

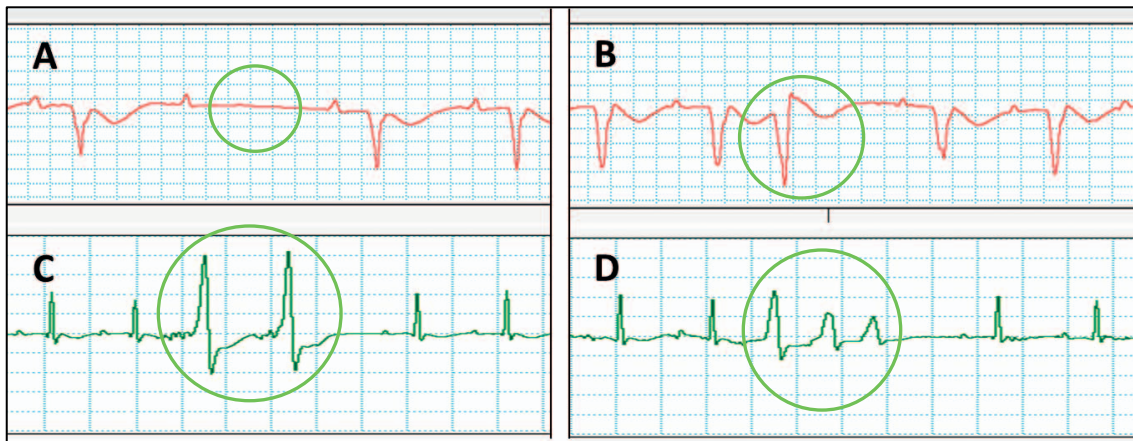


Abbildung 29: Pathologien im präischämischen Mäuse-EKG (jeweils hellgrün umrandet). A) AV-Block (Grad II), eine Vorhofaktion wird nicht auf die Ventrikel übergeleitet, es fehlt der QRS-Komplex B) VES mit charakteristischer Vorzeitigkeit, überlagerter P-Welle, verbreitertem und deformiertem QRS-Komplex und kompensatorischer Pause, C) VES-Couplet, D) VES-Triplet.

Da am häufigsten VES und AV-Blöcke auftraten, wurden diese für beide Genotypen statistisch analysiert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede:

Tabelle 17: Durchschnittliche Anzahl präischämisch aufgetretener Atrioventrikulärer Blockierungen und Ventrikulärer Extrasystolen.

n.s. = nicht signifikant.

Parameter	<i>Panx1^{+/+}</i> (n=8)	<i>Panx1^{-/-}</i> (n=10)	p-value
AV-Blöcke	31 ± 31	22 ± 24	n.s.
VES	61 ± 90	12 ± 18	n.s.

In den postischämischen EKGs von 15 untersuchten Tieren zeigten alle eine deutliche monophasische Deformierung und einen R-Zacken-Verlust (**Abbildung 30**).

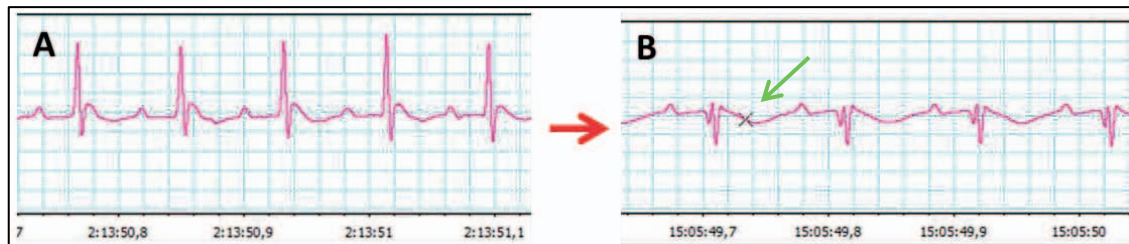


Abbildung 30: Präischmisches (A) und postischmisches (B) EKG vom gleichen Tier mit deutlich sichtbarer monophasisch deformierter ST-Strecke (x und grüner Pfeil) und R-Zacken-Verlust.

Weiterhin wurden bei allen Versuchstieren nach Ischämie in der Reperusionsphase Herzhrytmusstörungen festgestellt (**Abbildung 31**). Fünf *Panx1*^{+/+}- und alle neun *Panx1*^{-/-}-Mäuse zeigten AV-Blöcke. Sinuatriale Blockierungen wiesen fünf *Panx1*^{+/+}-Mäuse und eine *Panx1*^{-/-}-Maus auf. Bei allen *Panx1*^{+/+}- und acht *Panx1*^{-/-}-Mäusen konnten nach Ischämie VES beobachtet werden. Vereinzelt traten VES-Couplets (fünf *Panx1*^{+/+}- und sieben *Panx1*^{-/-}-Mäuse) und VES-Triplets (drei *Panx1*^{+/+}- und fünf *Panx1*^{-/-}-Mäuse) auf, außerdem Tachykardien (drei *Panx1*^{-/-}-Mäuse), Bigemini (zwei *Panx1*^{+/+}- und zwei *Panx1*^{-/-}-Mäuse) und Salven (eine *Panx1*^{+/+}- und eine *Panx1*^{-/-}-Maus).

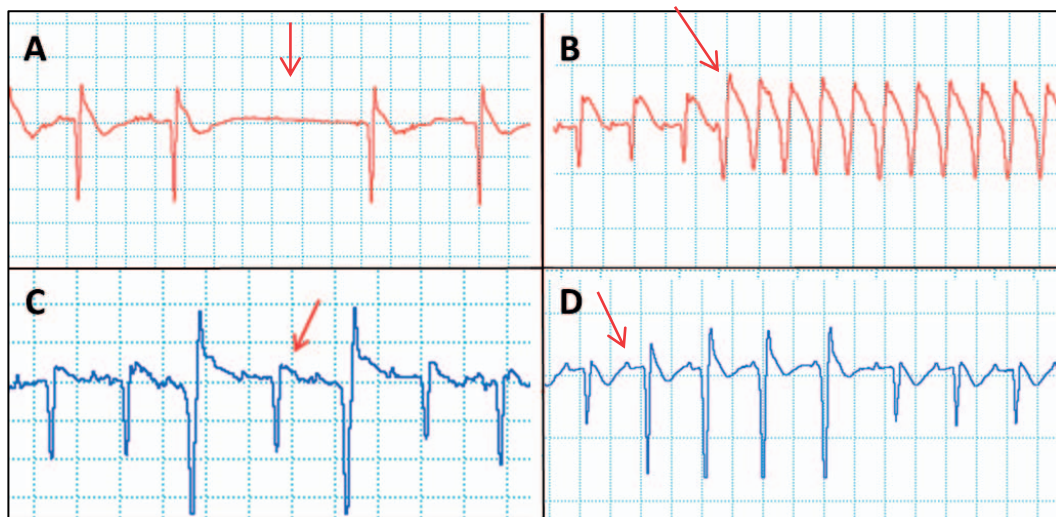


Abbildung 31: Pathologien im postischämischen Mäuse-EKG beider Genotypen. A) Sinuatrialer Block mit totaler Blockierung des Sinusimpulses, präautomatischer Pause und Knotenersatzrhythmus mit normalem QRS-Komplex ohne vorausgehende P-Welle (Grad 3, roter Pfeil), B) Ventrikuläre Tachykardie mit mehr als vier VES hintereinander (Beginn markiert durch den roten Pfeil), C) Bigemini mit zwei aufeinander folgenden VES mit einer (roter Pfeil) normalen Erregung dazwischen, D) Salve mit mehr als drei aufeinander folgenden VES (Beginn markiert durch den roten Pfeil).

Am häufigsten traten postischämisch AV-Blöcke und VES auf. Bei den AV-Blöcken zeigte sich postischämisch ein signifikanter (p-value 0,03*) Unterschied zwischen den Versuchsgruppen: Die *Panx1*^{+/+}-Mäuse wiesen signifikant weni-

ger ($2,8 \pm 4,2$) AV-Blöcke auf als die *Panx1*^{-/-}-Tiere ($19,4 \pm 22,6$). Hinsichtlich des Auftretens von VES konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden:

Tabelle 18: Durchschnittliche Anzahl postischämisch aufgetretener Atrioventrikulärer Blockierungen und Ventrikulärer Extrasystolen.
Ein Stern (*) kennzeichnet einen signifikanten Unterschied (p-value < 0,05) der Messdaten. n.s. = nicht signifikant.

Parameter	<i>Panx1</i> ^{+/+} (n=6)	<i>Panx1</i> ^{-/-} (n=9)	p-value
AV-Blöcke	$2,8 \pm 4,2$	$19,4 \pm 22,6$	0,03*
VES	$92,7 \pm 109,3$	$38,7 \pm 36,6$	n.s.

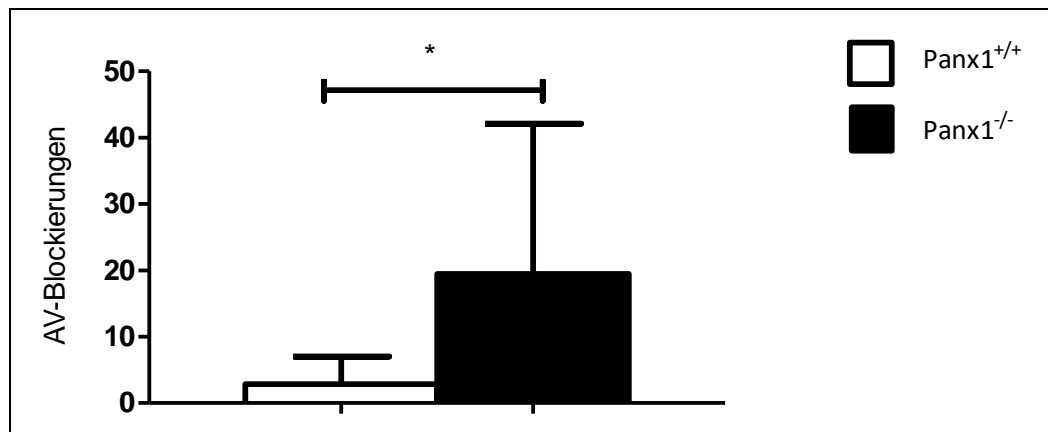


Abbildung 32: Vergleich der durchschnittlichen Anzahl von AV-Blockierungen im postischämischen EKG zwischen *Panx1*^{+/+}- (n=6) und *Panx1*^{-/-}-Mäusen (n=9). Ein Stern (*) kennzeichnet einen signifikanten Unterschied (p-value < 0,05) der Messdaten.

3.2.2 Ergebnisse der Zeiten- und Streckenanalyse

Für die genauere Untersuchung der De- und Repolarisation der Versuchstiere wurde mit Hilfe der *ECG-Analysis*-Funktion der *LabChart Pro*-Software eine Auswahl von je zwölf Abschnitten aus den präischämischen EKGs von acht *Panx1*^{+/+}- und zehn *Panx1*^{-/-}-Tieren getroffen und die einzelnen Streckenabschnitte und Amplituden untersucht. Dafür wurden aus jedem Abschnitt 60 Komplexe, also insgesamt 720 Herzaktionen pro Tier, verwendet.

Die Auswertung ergab eine statistisch signifikant verlängerte QT_c-Zeit bei den *Panx1*^{-/-}-Tieren (p-value 0,0003***). Während diese eine durchschnittliche QT_c-Zeit von $46,3 \pm 1,6$ ms aufwiesen, lag der Wert bei den *Panx1*^{+/+}-Tieren bei durchschnittlich $42,0 \pm 2,4$ ms. Ähnlich verhielt es sich mit der nicht-frequenzkorrigierten QT-Zeit (*Panx1*^{-/-}-Tiere $48 \pm 2,5$ ms, *Panx1*^{+/+}-Tiere $42,9 \pm$

3,7ms, p-value 0,003**). Auch die Dauer des QRS-Streckenabschnitts war bei den *Panx1*^{-/-}-Mäusen mit 12,2 ± 0,9ms statistisch signifikant länger als bei den *Panx1*^{+/+}- Mäusen (10,8 ± 1,1ms, p-value 0,007**).

Für die übrigen Parameter, die im Rahmen der Zeiten- und Streckenauswertung analysiert wurden, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen:

Tabelle 19: Ergebnisse der Zeiten- und Streckenauswertung. Es bestehen statistisch signifikante Unterschiede des QRS-, bzw. QT_c-Intervalls zwischen den Genotypen. Zwei Sterne (**) bezeichnen einen p-value < 0,01, drei Sterne (***) bezeichnen einen p-value < 0,001.

<i>Parameter</i>	<i>Panx1</i> ^{+/+} (n=8)	<i>Panx1</i> ^{-/-} (n=10)	<i>p-value</i>
Herzfrequenz (bpm)	588 ± 66	559 ± 69	n.s.
RR-Intervall (ms)	106 ± 13	112 ± 14,5	n.s.
P-Dauer (ms)	14 ± 3,2	13 ± 3	n.s.
PR-Intervall (ms)	36 ± 2	35 ± 2,7	n.s.
QRS-Intervall (ms)	10,8 ± 1,1	12,2 ± 0,9	0,007**
QT-Zeit (ms)	42,9 ± 3,7	48 ± 2,5	0,003**
QT _c -Zeit (ms)	42 ± 2,4	46,3 ± 1,6	0,0003***

Um zu ermitteln, ob es sich bei der verlängerten QT- bzw. QT_c-Zeit um die Folge des ebenfalls verlängerten QRS-Streckenabschnitts, also eine Störung der Reizweiterleitung, handelt, oder ob die *Panx1*-Defizienz viel mehr zu einer gestörten Repolarisation führt, wurde weiterhin die Differenz zwischen QT- und QRS-Abschnitt (sog. JT-Zeit) aller Tiere berechnet und verglichen.

Hierbei zeigten die *Panx1*^{-/-}-Tiere mit einer durchschnittlichen Dauer von 35,8 ± 2,4ms eine signifikant verlängerte Differenz zwischen QT- und QRS-Zeit im Vergleich mit den *Panx1*^{+/+}-Mäusen (32,1 ± 3,6ms, p-value 0,0208*):

Tabelle 20: Differenz zwischen QT- und QRS-Abschnitt (sog. JT-Zeit). Diese ist bei den *Panx1*^{-/-}-Mäusen signifikant (p-value < 0,05*) länger als bei den *Panx1*^{+/+}-Mäusen.

<i>Parameter</i>	<i>Panx1</i> ^{+/+} (n=8)	<i>Panx1</i> ^{-/-} (n=10)	<i>p-value</i>
JT-Zeit (ms)	32,1 ± 3,6	35,8 ± 2,4	0,0208*

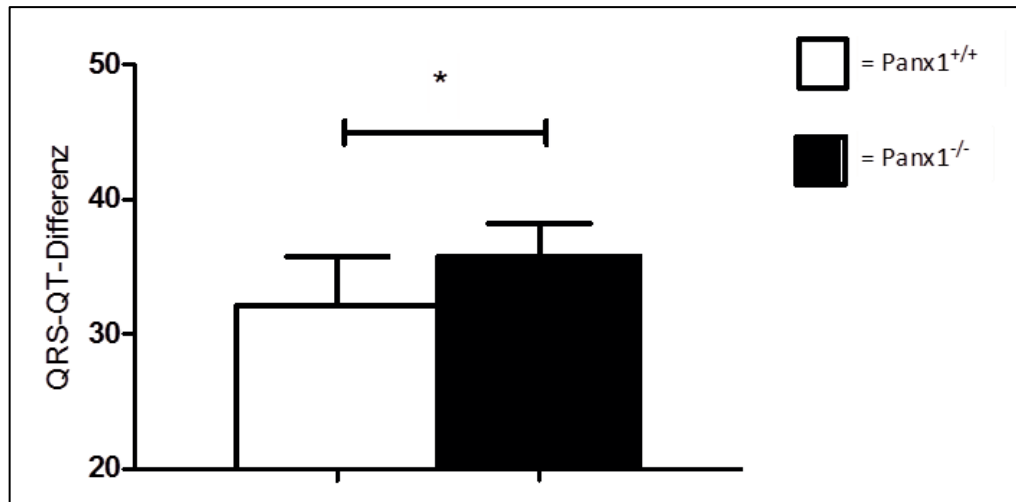


Abbildung 33: Graphische Darstellung der Differenz zwischen den QRS- und den QT-Intervallen (JT-Zeit) beider Genotypen. Diese ist bei den $Panx1^{-/-}$ -Mäusen (n=10) signifikant (p-value < 0,05*) länger als bei den $Panx1^{+/+}$ -Mäusen (n= 8).

3.2.3 Ergebnisse der *Heart Rate Variability*

Zur Detektion einer verminderten Anpassungsfähigkeit des Herzens an unterschiedliche Belastungen wurde die Heart Rate Variability prä- und postischämisch untersucht und Genotypen-vergleichend betrachtet. Hierfür wurden die selektierten 48 Abschnitte pro Tier (24 prä- und 24 postischämische) ausgewertet.

Die Auswertung erfolgte innerhalb der deskriptiv-statistischen *Time Domain Analysis* und der auf der Fast Fourier Transformation basierenden *Frequency Domain Analysis*. Insgesamt wurden acht $Panx1^{+/+}$ -Tiere und zehn $Panx1^{-/-}$ -Tiere untersucht. Die Daten weiterer 17 $Panx1^{+/+}$ -Tiere und 20 $Panx1^{-/-}$ -Tiere unserer Arbeitsgruppe flossen nachträglich in die präischämische Analyse mit ein.

Time Domain

Bei der Zeitbereichsanalyse zeigten sich sowohl vor als auch nach Ischämie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen:

Tabelle 21: Ergebnisse der Zeitbereichsanalyse vor und nach Ischämie: Vergleich der Genotypen untereinander. n.s. = nicht signifikant.

<i>Parameter</i>	<i>Vor Ischämie</i>			<i>Nach Ischämie</i>		
	<i>Panx1^{+/+}</i> (n=25)	<i>Panx1^{-/-}</i> (n=30)	<i>p-value</i>	<i>Panx1^{+/+}</i> (n=8)	<i>Panx1^{-/-}</i> (n=10)	<i>p-value</i>
Mean NN (ms)	116 ± 18	117 ± 15	n.s.	99 ± 6	101 ± 7	n.s.
SDNN (ms)	9 ± 3	9 ± 2	n.s.	3 ± 2	3 ± 1	n.s.
RMSSD (ms)	6 ± 3	7 ± 3	n.s.	2 ± 1	2 ± 1	n.s.
NN6 (%)	30 ± 16	38 ± 18	n.s.	2 ± 1	2 ± 1	n.s.

Deutliche Veränderungen zeigten sich beim Vergleich der Parameter vor und nach Ischämie, bezogen auf die einzelnen Genotypen. Bei beiden verschlechterten sich die Messwerte nach Ischämie statistisch signifikant:

Tabelle 22: Ergebnisse der Zeitbereichsanalyse: Prä- und postischämische Werte der einzelnen Genotypen im Vergleich. Ein Stern (*) bezeichnet einen p-value < 0,05, zwei Sterne (**) bezeichnen einen p-value < 0,01, drei Sterne (***) bezeichnen einen p-value < 0,001.

<i>Parameter</i>	<i>Panx1^{+/+}</i>			<i>Panx1^{-/-}</i>		
	<i>prä</i> (n=8)	<i>post</i> (n=8)	<i>p-value</i> <i>prä/post</i>	<i>prä</i> (n=10)	<i>post</i> (n=10)	<i>p-value</i> <i>prä/post</i>
Mean NN (ms)	107 ± 9	99 ± 6	0,0117*	116 ± 10	101 ± 7	< 0,0001***
SDNN (ms)	7 ± 3	3 ± 2	0,0002***	9 ± 1	3 ± 1	<0,0001***
RMSSD (ms)	5 ± 2	2 ± 1	0,0043**	7 ± 2	2 ± 1	<0,0001***
NN6 (%)	12 ± 5	1 ± 1	0,0001***	28 ± 9	2 ± 2	<0,0001***

Frequency Domain

Nach Analyse der verschiedenen Frequenzbänder zeigten sich beim Vergleich der Genotypen untereinander vor und nach Ischämie keine Unterschiede zwischen *Panx1*^{+/+}- und *Panx1*^{-/-}-Mäusen:

Tabelle 23: Ergebnisse der Frequenzbereichsanalyse vor und nach Ischämie: Vergleich der Genotypen untereinander. n.s. = nicht signifikant.

Parameter	Vor Ischämie			Nach Ischämie		
	<i>Panx1</i> ^{+/+} (n=25)	<i>Panx1</i> ^{-/-} (n=30)	p-value	<i>Panx1</i> ^{+/+} (n=8)	<i>Panx1</i> ^{-/-} (n=10)	p-value
TP (ms ²)	91 ± 58	82 ± 34	n.s.	11 ± 6	13 ± 7	n.s.
VLF (ms ²)	27 ± 17	23 ± 13	n.s.	4 ± 3	5 ± 3	n.s.
LF (ms ²)	45 ± 33	39 ± 18	n.s.	5 ± 3	6 ± 4	n.s.
HF (ms ²)	26 ± 7	30 ± 9	n.s.	2 ± 2	1 ± 1	n.s.
LF/HF	5 ± 2	4 ± 2	n.s.	5 ± 2	5 ± 3	n.s.

Beim Vergleich der frequenzbasierten Parameter vor und nach Ischämie zeigten sich, in Korrelation mit den Ergebnissen der Zeitbereichsanalyse, statistisch signifikante Unterschiede bei beiden Genotypen:

Tabelle 24: Ergebnisse der Frequenzbereichsanalyse: Prä- und postischämische Werte der einzelnen Genotypen im Vergleich. Ein Stern (*) bezeichnet einen p-value < 0,05, zwei Sterne (**) bezeichnen einen p-value < 0,01, drei Sterne (***) bezeichnen einen p-value < 0,001. n.s. = nicht signifikant.

Parameter	<i>Panx1</i> ^{+/+}			<i>Panx1</i> ^{-/-}		
	prä (n=8)	post (n=8)	p-value prä/post	prä (n=10)	post (n=10)	p-value prä/post
TP (ms ²)	54 ± 26	11 ± 6	0,0113**	87 ± 27	13 ± 6	< 0,0001***
VLF (ms ²)	19 ± 10	4 ± 3	0,0034**	26 ± 12	5 ± 3	<0,0001***
LF (ms ²)	26 ± 14	5 ± 3	0,0011**	41 ± 13	6 ± 4	<0,0001***
HF (ms ²)	8 ± 4	2 ± 2	0,0009***	21 ± 12	1 ± 1	<0,0001***
LF/HF	6 ± 1	5 ± 2	n.s.	4 ± 1	5 ± 3	0,0138*

3.2.4 Ergebnisse der *Heart Rate Turbulence*-Analyse nach myokardialer Ischämie

Eine reduzierte oder vollständig aufgehobene HRT nach Myokardinfarkt gilt in der Klinik als Risikomarker für die Mortalität. Um in dem vorliegenden Tiermodell eine verminderte Baroreflexsensitivität nach Ischämie und Unterschiede zwischen den Genotypen aufzuzeigen, wurde anhand einer Auswahl spontan auftretender VES die *Heart Rate Turbulence* ermittelt.

Präischämisch konnte die HRT nicht bestimmt werden, da zu wenige Versuchstiere VES zeigten. Die Berechnung wurde daher ausschließlich postischämisch bei sechs *Panx1*^{+/+}- und acht *Panx1*^{-/-}-Tieren durchgeführt, da auch nach der Ischämie die EKGs von vier Tieren keine VES aufwiesen.

Es wurden jeweils zehn VES aus dem postischämischen EKG selektiert und daran die Parameter *Turbulence Onset* und *Turbulence Slope* bestimmt. Es konnten für beide Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden. Der Mittelwert für den TO, der die prozentuale Änderung des RR-Intervalls in der initialen Phase nach einer VES beschreibt, lag für die *Panx1*^{+/+}-Mäuse bei -0,49% bei einer Standardabweichung von 1,2%. Zwei von sechs Tieren wiesen einen TO > 0% auf, was einer Verlangsamung der Herzfrequenz entspricht und als pathologisch bewertet wird.

Bei den *Panx1*^{-/-}-Mäusen lag der TO im Mittel bei 0,76% und zeigte eine Standardabweichung von 2%. Einzeln betrachtet wies die Hälfte der Tiere Werte > 0% auf, die andere Hälfte zeigte einen physiologischen TO < 0%, also einen Anstieg der Herzfrequenz.

Auch die Werte für den TS, der die Normalisierung der Herzfrequenz in der späten Phase nach einer VES repräsentiert, wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen auf. Bis auf eine *Panx1*^{-/-}- Maus zeigten alle Tiere einen positiven TS, der bei den *Panx1*^{+/+}-Tieren im Mittel bei 0,32ms/RRi mit einer SD von 0,2ms/RR-Intervall und bei den *Panx1*^{-/-}-Tieren im Mittel bei 0,51ms/RRi bei einer SD von 0,3ms/RRi lag. Somit wiesen alle Tiere einen *Turbulence Slope* unterhalb des physiologischen Grenzwertes von 2,5ms/RRi auf.

Tabelle 25: Ergebnisse des *Turbulence Onset* (TO) und des *Turbulence Slope* (TS) beider Genotypen. n.s. = nicht signifikant.

<i>Parameter</i>	<i>Pan-1</i> ^{+/+} (n=6)	<i>Pan-1</i> ^{-/-} (n=8)	<i>p-value</i>
TO (%)	-0,49 ± 1,2	0,76 ± 2	n.s.
TS (ms/ RRI)	0,32 ± 0,2	0,51 ± 0,3	n.s.

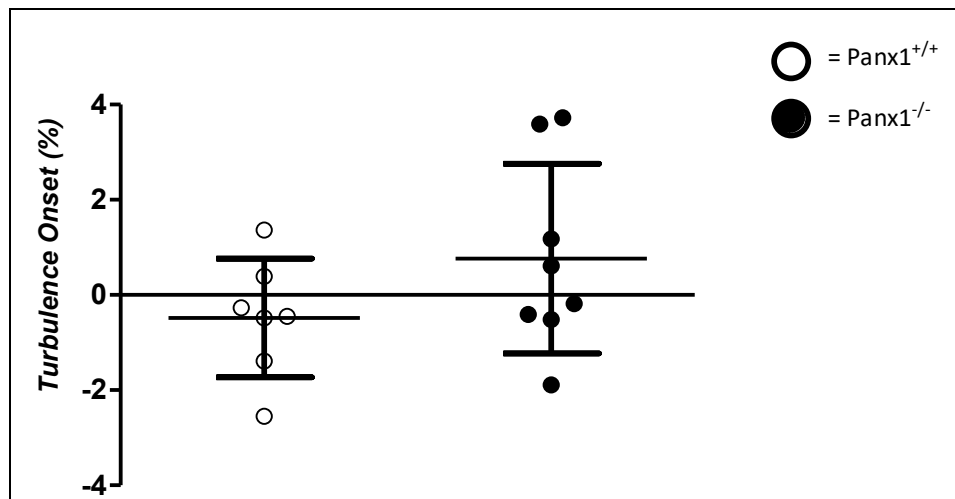


Abbildung 34: Graphische Darstellung der Ergebnisse für den *Turbulence Onset* (TO) beider Genotypen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied. n = 6 (*Panx1*^{+/+}-Mäuse) und 8 (*Panx1*^{-/-}-Mäuse).

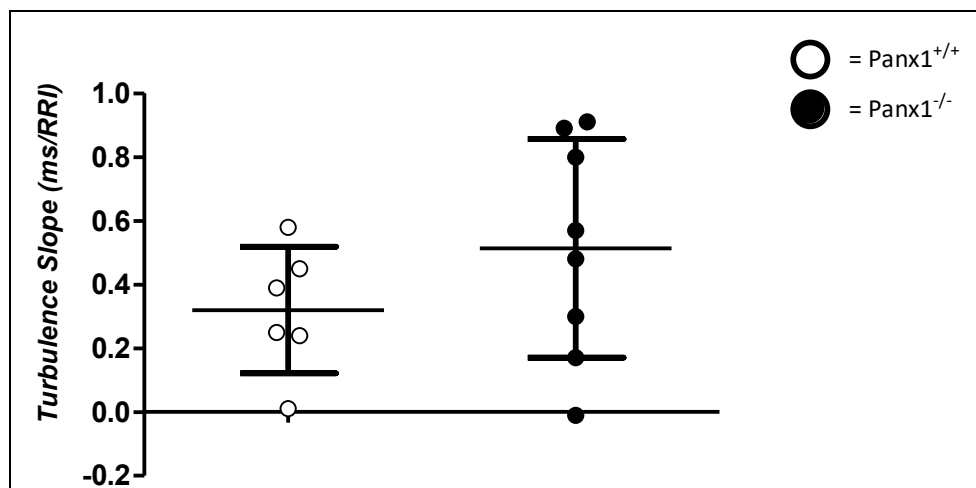


Abbildung 35: Graphische Darstellung der Ergebnisse für den *Turbulence Slope* (TS) beider Genotypen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied. n = 6 (*Panx1*^{+/+}-Mäuse) und 8 (*Panx1*^{-/-}-Mäuse).

3.3 Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchung

Zur Ermittlung der Morphologie und Funktion des Herzens und deren Veränderungen durch den Myokardinfarkt wurde bei acht *Panx1^{+/-}*- und zehn *Panx1^{-/-}*-Tieren eine prä-, respektive bei sechs *Panx1^{+/-}*- und zehn *Panx1^{-/-}*-Mäusen eine postischämische echokardiographische Untersuchung durchgeführt. Sowohl bei prä- als auch bei postischämischer Betrachtung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen.

Präischämisch wies die Ejektionsfraktion (EF) bei den *Panx1^{-/-}*-Tieren nicht signifikant niedrigere Werte ($51 \pm 9\%$) auf als bei den *Panx1^{+/-}*-Tieren ($55 \pm 11\%$). Weiterhin zeigten die *Panx1^{-/-}*-Tiere ein nicht signifikant geringeres ($38 \pm 6\mu\text{l}$) Schlagvolumen (SV) als die *Panx1^{+/-}*-Mäuse ($41 \pm 5\mu\text{l}$). Analog dazu war bei den *Panx1^{-/-}*-Mäusen das Herzzeitvolumen (CO) nicht signifikant kleiner ($17 \pm 5\text{ml/min}$) als bei ihren *Panx1^{+/-}*-Wurfgeschwistern ($19 \pm 3\text{ml/min}$). Die Verkürzungsfraktion (FS) war bei den *Panx1^{+/-}*-Mäusen nicht signifikant größer ($29 \pm 7\%$) als bei den *Panx1^{-/-}*-Mäusen ($26 \pm 6\%$).

Die Maximalgeschwindigkeit des Flusses über die Aortenklappe (AoV Peak Vel) zeigte bei den *Panx1^{-/-}*-Tieren nicht signifikant höhere Werte ($1516 \pm 343\text{mm/s}$) als bei den *Panx1^{+/-}*-Mäusen ($1380 \pm 265\text{mm/s}$).

Der Blutfluss über die Mitralklappen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. Die Geschwindigkeit der E-Welle (MV E) lag bei den *Panx1^{+/-}*-Tieren bei $704 \pm 101\text{mm/s}$ und die der A-Welle (MV A) bei $486 \pm 115\text{mm/s}$. Bei den *Panx1^{-/-}*-Mäusen lag die der E-Welle bei $629 \pm 85\text{mm/s}$ und die der A-Welle bei $434 \pm 93\text{mm/s}$. Das Verhältnis der E- zur A-Welle zeigte bei beiden Genotypen den gleichen Quotienten von $1,5 \pm 0,2$.

Die durchschnittliche Herzfrequenz lag bei den *Panx1^{+/-}*-Tieren bei $464 \pm 47\text{bpm}$ und war bei den *Panx1^{-/-}*-Wurfgeschwistern mit $453 \pm 62\text{bpm}$ nicht signifikant geringer.

Postischämisch verschlechterten sich die Funktionsparameter erwartungsgemäß bei beiden Genotypen, wobei sich diese Einschränkung bei den *Panx1^{+/-}*-Tieren als signifikanter erwies als bei den *Panx1^{-/-}*-Tieren. Die EF lag bei den *Panx1^{+/-}*-Mäusen bei $34 \pm 19\%$ und bei den *Panx1^{-/-}*-Tieren bei $43 \pm 5\%$. Hier bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen. Auch die Unterschiede zwischen dem Herzminutenvolumen (CO, *Panx1^{+/-}*-Mäuse: $13 \pm 5\text{ml/min}$ und *Panx1^{-/-}*-Mäuse: $16 \pm 3\text{ml/min}$), dem Schlagvolumen (SV, *Panx1^{+/-}*-

Tiere: $27 \pm 9\mu\text{l}$ und *Panx1*^{-/-}-Tiere: $33 \pm 6\mu\text{l}$) und der Verkürzungsfraction (FS, *Panx1*^{+/+}-Mäuse: $17 \pm 10\%$ und *Panx1*^{-/-}-Mäuse: $21 \pm 3\%$) waren postischämisch nicht signifikant.

Weiterhin zeigte die maximale Geschwindigkeit des Blutflusses über die Aortenklappe (AoV Peak Vel), die bei den *Panx1*^{+/+}-Mäusen bei $1208 \pm 202\text{mm/s}$ und bei den *Panx1*^{-/-}-Mäusen bei $1364 \pm 258\text{mm/s}$ lag, keine signifikante Abweichung zwischen den Versuchsgruppen.

Der Fluss über die Mitralklappe hatte bei den *Panx1*^{+/+}-Mäusen für die E-Welle eine Geschwindigkeit von $478 \pm 76\text{mm/s}$ und für die A-Welle $285 \pm 107\text{mm/s}$. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den Werten der *Panx1*^{-/-}-Wurfgeschwister: Bei ihnen lag die Geschwindigkeit der E-Welle bei $501 \pm 112\text{mm/s}$ und die der A-Welle bei $354 \pm 92\text{mm/s}$. Der Quotient aus E- und A-Welle (MV E/A), der bei den *Panx1*^{+/+}-Tieren bei $1,9 \pm 0,8$ und bei den *Panx1*^{-/-}-Tieren bei $1,4 \pm 0,2$ lag, wies ebenfalls keinen signifikanten Unterschied auf. Gleiches galt für die postischämische Herzfrequenz beider Genotypen: Diese zeigte bei den *Panx1*^{+/+}-Tieren einen Durchschnittswert von $492 \pm 48\text{bpm}$ und bei den *Panx1*^{-/-}-Tieren $476 \pm 41\text{bpm}$.

Um die Folgen des Myokardinfarkts Genotyp-spezifisch zu beurteilen, wurden außerdem die Parameter der prä- mit denen der postischämischen Echokardiographie verglichen. Dabei zeigte sich postischämisch bei den *Panx1*^{+/+}-Mäusen eine signifikante (p-value 0,0173*) Abnahme der Ejektionsfraction, auch das Schlagvolumen, das Herzzeitvolumen und die Verkürzungsfraction waren signifikant verringert (SV: p-value 0,0125*, CO: p-value 0,0342*, FS: p-value 0,0174*).

Darüber hinaus war bei diesen Tieren der Fluss über die Mitralklappe nach der Ischämie signifikant reduziert (MV E Vel: p-value 0,0066**, MV A Vel: p-value 0,0284*). Der Quotient aus E- und A-Welle verschob sich bei dieser Versuchsgruppe nach Ischämie in Richtung einer höheren Geschwindigkeit der A-Welle. Diese Verschiebung erwies sich als nicht signifikant.

Obige Signifikanzen waren bei den *Panx1*^{-/-}, abgesehen von einer statistisch signifikanten Abnahme der Ejektions- und der Verkürzungsfraction (p-value 0,0368* bzw. p-value 0,0308*) sowie einer statistisch signifikanten Verlangsamung der E-Welle (p-value 0,0216*), nicht zu beobachten. Insgesamt war somit

bei den *Panx1*^{-/-}-Tieren postischämisch eine weniger starke Einschränkung der echokardiographisch erhobenen Funktionsparameter zu verzeichnen.

Tabelle 26: Darstellung der echokardiographisch erhobenen systolischen Funktionsparameter. Vergleich zwischen prä- und postischämischen Werten sowie zwischen den Genotypen. Ein Stern (*) bezeichnet einen p-value < 0,05. n.s. = nicht signifikant.

Para- meter	<i>Panx1</i> ^{+/+} prä (n=8)	<i>Panx1</i> ^{+/+} post (n=6)	<i>Panx1</i> ^{-/-} prä (n=10)	<i>Panx1</i> ^{-/-} post (n=10)	p-value WT prä/post	p-value KO prä/post	p-value WT/KO prä	p-value WT/KO post
bpm	464 ± 47	492 ± 48	453 ± 62	476 ± 41	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
FS (%)	29 ± 7	17 ± 10	26 ± 6	21 ± 3	0,0174*	0,0308*	n.s.	n.s.
CO (ml/min)	19 ± 3	13 ± 5	17 ± 5	16 ± 3	0,0342*	n.s.	n.s.	n.s.
EF (%)	55 ± 11	34 ± 19	51 ± 9	43 ± 5	0,0173*	0,0368*	n.s.	n.s.
SV (µl)	41 ± 5	27 ± 9	38 ± 6	33 ± 6	0,0125*	n.s.	n.s.	n.s.
AoV Peak Vel (mm/s)	1380 ± 265	1208 ± 202	1516 ± 343	1364 ± 258	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 27: Darstellung der echokardiographisch erhobenen diastolischen Funktionsparameter. Vergleich zwischen prä- und postischämischen Werten sowie zwischen den Genotypen. Ein Stern (*) bezeichnet einen p-value < 0,05, zwei Sterne (**) bezeichnen einen p-value < 0,01. n.s. = nicht signifikant.

Para- meter	<i>Panx1</i> ^{+/+} prä (n=8)	<i>Panx1</i> ^{+/+} post (n=6)	<i>Panx1</i> ^{-/-} prä (n=10)	<i>Panx1</i> ^{-/-} post (n=10)	p-value WT prä/post	p-value KO prä/post	p-value WT/KO prä	p-value WT/KO post
MV E (mm/s)	704 ± 101	478 ± 76	629 ± 85	501 ± 112	0,0066**	0,0216*	n.s.	n.s.
MV A (mm/s)	486 ± 115	285 ± 107	434 ± 93	354 ± 92	0,0284*	n.s.	n.s.	n.s.
MV E/A	1,5 ± 0,2	1,9 ± 0,8	1,5 ± 0,2	1,4 ± 0,2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

3.4 Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Millar-Katheter

Als invasive Technik zur Bestimmung der linksventrikulären Funktion fand vor der finalen Herzentnahme eine Analyse der kardialen Hämodynamik mittels eines Druck-Volumen-Katheters statt. Diese Untersuchung konnte nicht bei allen Versuchstieren erfolgreich durchgeführt werden, da insbesondere beim Vorschieben des Katheters über die Aortenklappe in den linken Ventrikel diese leicht verletzt wird oder ein Vorschieben gar nicht möglich ist, sodass nur intra-aortale Messwerte erhoben werden können. Bei einer *Panx1*^{+/-}- und einer *Panx1*^{-/-}-Maus konnten weder in der Aorta noch im Herzen Messungen erfolgen. Bei diesen Tieren fanden umgehend die Herzentnahme und -färbung statt (**vgl. Kapitel 2.4.4**). Bei den übrigen Versuchstieren wurden die erhobenen Parameter der Messung in der Aorta, im linken Ventrikel und nach Zuleitung von Noradrenalin (NA) über einen Perfusor verglichen. Bei beiden Genotypen verbesserten sich nach der Verabreichung von Noradrenalin der endsystolische Druck (PES, *Panx1*^{+/-}-Tiere: p-value 0,0281*, *Panx1*^{-/-}-Tiere: p-value 0,0429*) und die maximale systolische Druckentwicklung (dP/dt_{\max} , *Panx1*^{+/-}-Tiere: p-value 0,0040**, *Panx1*^{-/-}-Tiere: p-value 0,0368*) im linken Ventrikel statistisch signifikant (**Tabelle 28**). Alle anderen Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede vor und nach der Noradrenalin-Perfusion und es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen.

Tabelle 28: Mittels Millar-Katheter erhobene Druckwerte aus der Aorta und dem linken Ventrikel. Nach der ersten intrakardialen Messung wurden weitere Werte unter Noradrenalin-Einwirkung (+NA) gemessen. Nach Zuleitung von NA verbesserten sich der PES und die dP/dt_{\max} statistisch signifikant. Ein Stern (*) bezeichnet einen p-value < 0,05, zwei Sterne (**) bezeichnen einen p-value < 0,01. n.s. = nicht signifikant.

Para-meter	<i>Panx1</i> ^{+/+} BASE (n=7)	<i>Panx1</i> ^{+/+} +NA (n=7)	<i>Panx1</i> ^{-/-} BASE (n=9)	<i>Panx1</i> ^{-/-} +NA (n=9)	p-value WT BASE/ +NA	p-value KO- BASE/ +NA	p-value WT/KO BASE	p-value WT/KO +NA
P_{max} Aorta (mmHg)	82,8 ± 4,9	-	80,8 ± 7,9	-	-	-	n.s.-	-
P_{min} Aorta (mmHg)	55,6 ± 5,3	-	53,8 ± 8,7	-	-	-	n.s.-	-
PED (mmHg)	-0,5 ± 1,7	0,3 ± 4,6	1,9 ± 2,7	0,6 ± 1,1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PES (mmHg)	80,5 ± 5,0	91 ± 8,3	84,4 ± 8,0	93,9 ± 11,2	0,0281*	0,0429*	n.s.	n.s.
dP/dt_{max} (mmHg/s)	9168 ± 1381	10881 ± 1490	8732 ± 1772	11336 ± 2232	0,0040**	0,0368*	n.s.	n.s.
dP/dt_{min} (mmHg/s)	-8005 ± 1029	-8208 ± 1112	-7323 ± 1282	-8519 ± 1722	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HR (bpm)	636 ± 24	596 ± 70	636 ± 27	625 ± 49	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

3.5 Ergebnisse der Infarktplanimetrie

Mit Hilfe der TTC-Färbung und der anschließenden Infarktplanimetrie ist es möglich, infarziertes Gewebe zu visualisieren. Darüber hinaus kann auf diese Weise zwischen nekrotischen Arealen und solchen, die zwar zum Versorgungsgebiet der ligierten Koronararterie gehören, jedoch noch lebende Zellen enthalten, unterschieden werden (sog. *Area At Risk*, AAR).

Bei der anschließenden Auswertung wurden die Infarkte von sieben *Panx1*^{+/+}- und zehn *Panx1*^{-/-}-Mäusen analysiert.

Die Infarktgröße wurde in % der AAR angegeben und zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Panx1*^{+/+}-Tieren (40 ± 8%) und den *Panx1*^{-/-}-Tieren (29 ± 5%):

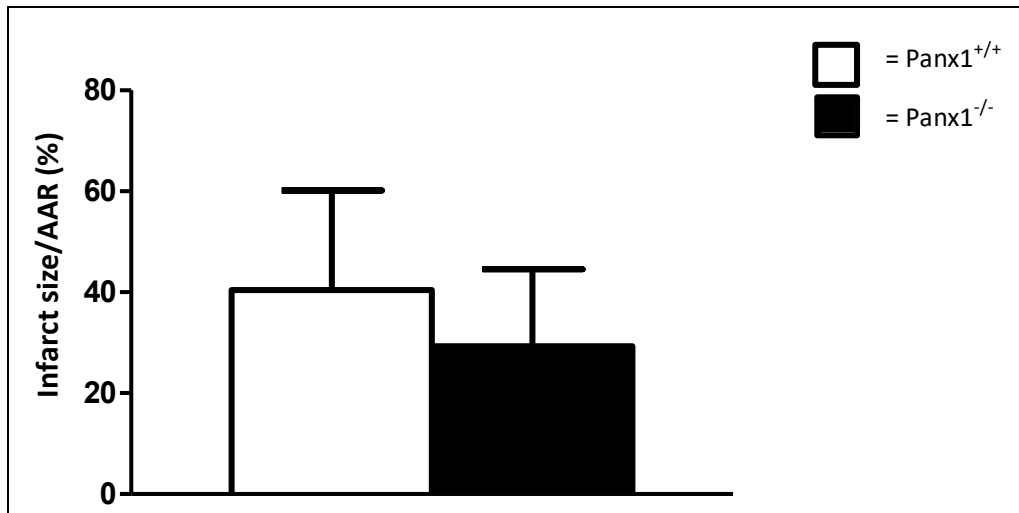


Abbildung 36: Graphische Darstellung der Infarktgrößen nach TTC-Färbung. Diese werden in % der AAR angegeben. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen $Panx1^{+/+}$ -Mäusen (n=7) und $Panx1^{-/-}$ -Mäusen (n=10).

Auch die *Area At Risk* (AAR), also der Bereich, der zum Versorgungsgebiet der ligierten Koronararterie gehört, in dem sich jedoch neben nekrotischen Zellen auch noch lebende befinden, war bei den $Panx1^{-/-}$ -Tieren ($53 \pm 8\%$) bezogen auf die gesamte Ventrikelgröße nicht signifikant kleiner als bei den $Panx1^{+/+}$ -Tieren ($56 \pm 6\%$):

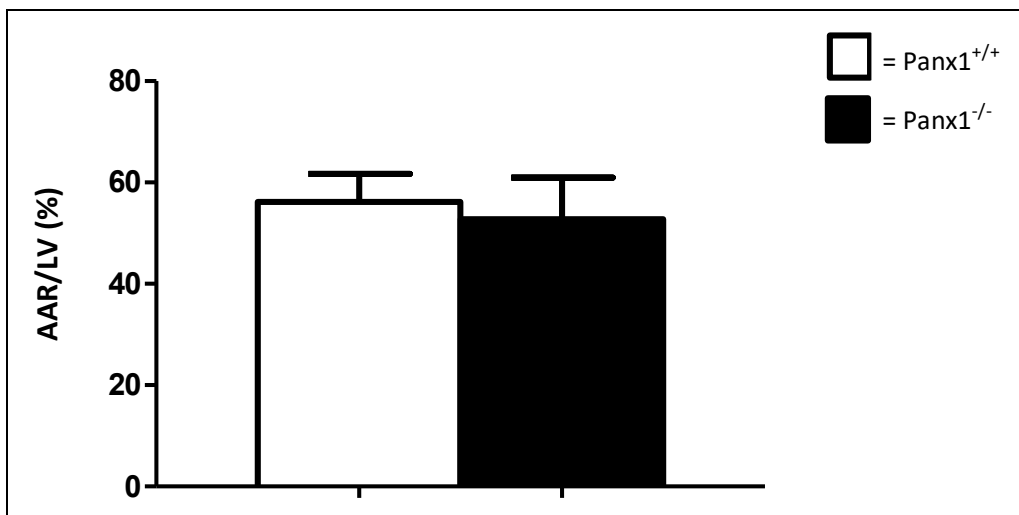


Abbildung 37: Graphische Darstellung der Größe der Area At Risk (AAR). Diese wird in % des linken Ventrikels (LV) angegeben. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen $Panx1^{+/+}$ -Mäusen (n=7) und $Panx1^{-/-}$ -Mäusen (n=10).

3.6 Ergebnisse der Paraffineinbettungen

Für die qualitative Analyse der kardialen Zellmorphologie wurden Paraffinschnitte der Herzen von jeweils zwei *Panx1^{+/-}*- und zwei *Panx1^{-/-}*-Mäusen angefertigt und lichtmikroskopisch untersucht.

Dabei wurde jeder verwendbare Schnitt in verschiedenen Vergrößerungen (25-, 50- und 100-fach) mäanderartig durchgemustert und auf morphologische Auffälligkeiten wie entzündliche Vorgänge, Fibrose, Hypertrophie und Anzeichen des Zelluntergangs hin untersucht.

Es konnten keine qualitativen Unterschiede hinsichtlich der Anatomie der Schnitte (Myokardtextur, Klappenapparat, Papillarmuskeln) zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden:



Abbildung 38: Herzschnitt (quer) auf Mitte der Ventrikel. (*Panx1^{+/-}*-Maus, 25-fache Vergrößerung, HE-Färbung).

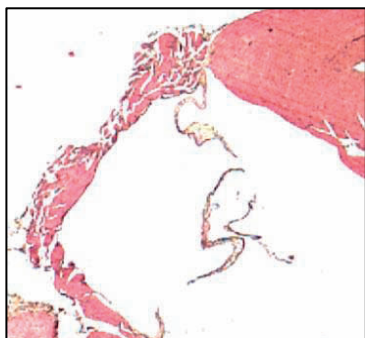


Abbildung 39: Trikuspidalklappe (*Panx1^{-/-}*-Maus, 50-fache Vergrößerung, HE-Färbung).

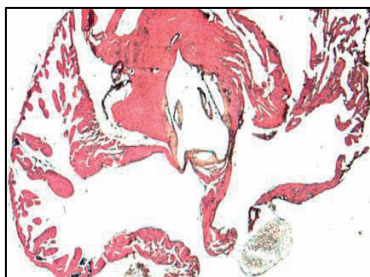


Abbildung 40: Aortenklappe (Bildmitte) und Teile der Vorhöfe (links und rechts im Bild). (*Panx1^{-/-}*-Maus, 50-fache Vergrößerung, HE-Färbung).

4 Diskussion

Die vorliegende Dissertation baut auf dem vorausgegangenen Projekt unserer Arbeitsgruppe, der kardialen Phänotypisierung der *Panx1*^{-/-}-Maus, auf. Ziel des aktuellen Projekts war es, die akuten Auswirkungen einer kardialen Ischämie und Reperfusion *in vivo* an *Panx1*^{+/+}- und *Panx1*^{-/-}-Mäusen zu untersuchen und zu vergleichen. Dazu wurden zunächst EKG-Transmitter für die telemetrische Elektrokardiographie implantiert, nachfolgend experimentell eine kardiale Ischämie ausgelöst und anschließend deren Auswirkungen auf elektrophysiologische und hämodynamische sowie histologische Parameter bestimmt. Parallel dazu fand eine rein qualitative histologische Untersuchung der Herzmorphologie *Panx1*^{+/+}- und *Panx1*^{-/-}-Tiere statt.

4.1 Diskussion der *Panx1*^{-/-}-Maus als transgenes Tiermodell

Wenngleich Maus und Mensch taxonomisch beide zu den *Mammalia*, also den Säugern, gehören, erscheint es zunächst fragwürdig, ausgerechnet ein Tier, dessen Herzfrequenz beinahe zehnmal so hoch ist, wie die eines Erwachsenen, und dessen Blutdruckwerte beim Menschen als hyperten bewertet würden, als Modelltier für die vorliegende Fragestellung zu verwenden.

Auch das AP der Maus unterscheidet sich von dem des Menschen (**vgl. Kapitel 2.5.1**) und die Größe des Herzens sowie weitere strukturelle Unterschiede sind offensichtlich. Aufgrund der guten Verfügbarkeit transgener und Knockout-Linien und der relativ leichten genetischen Modifikation stellt die Maus jedoch eines der „attraktivsten Tiermodelle für die Erforschung molekularer Grundlagen des Herzversagens dar“ (Zaragoza *et al.*, 2011).

Insbesondere mit der Entwicklung eines Modells, bei dem der experimentellen Ischämie eine Reperfusion folgt, eröffneten Michael *et al.* 1995 neue Möglichkeiten, die histopathologischen Auswirkungen eines Infarktes im Mausmodell genauer zu untersuchen (Michael *et al.*, 1995).

Wird sonst bei kardiovaskulären Fragestellungen in vielen Fällen das Schwein mit seiner dem Menschen ähnlichen kardialen Blutversorgung (Beidseitig koronarer Versorgungstyp, vgl. Mensch: Intermediärtyp, ausgeglichene Versorgung) und einer geringfügigen Ausbildung von myokardialen Kollateralen (O`Konski *et al.*, 1987) bspw. als Modelltier im Rahmen von Katheter-Untersuchungen ver-

wendet (Suzuki *et al.*, 2011), kam dieses Tier im vorliegenden Projekt als Modell nicht infrage, da uns bis zum jetzigen Zeitpunkt keine entsprechende Knockout-Zuchtlinie bekannt ist.

Auch die vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, bei denen Expressionsanalysen ein *panx1*-Expressionslevel von $72,3 \pm 14\%$ im murinen Vorhof und $44,6 \pm 19,5\%$ im Ventrikel zeigten (Petric *et al.*, 2016), und die Tatsache, dass Mensch und Maus ein ähnliches Expressionsmuster der kardialen Ionenkanäle aufweisen (**vgl. Kapitel 4.3.2**), machten die Maus als Modelltier für weitere Untersuchungen attraktiv.

Die Expressionsmuster von murinem *panx2* und -3 wurden von uns bisher nicht untersucht, da beide Proteine nicht im Herzen exprimiert werden (Baranova *et al.*, 2004). Auch für andere Ionenkanäle, die in unserer Zuchtlinie kompensatorisch hochreguliert sein könnten, wurden von unserer Arbeitsgruppe keine sog. *Gene Expression Arrays* durchgeführt, da die Hochregulation eines Fremdgens in den *Panx1*^{-/-}-Tieren bisher in der Literatur nicht beschrieben ist. Wir können dies nicht endgültig ausschließen, dennoch sind alle Unterschiede zwischen den beiden Genotypen als Folge der *Panx1*-Defizienz zu interpretieren.

Eine weitere Möglichkeit, die Rolle des Panx1 im Rahmen der Ischämie und Reperfusion zu untersuchen, wäre eine pharmakologische Blockade gewesen. Hierfür stehen unseres Wissens bis zum jetzigen Zeitpunkt zwar mehrere potente, jedoch keine spezifischen Inhibitoren zur Verfügung (**vgl. Kapitel 1.3.3.5**).

4.2 Diskussion der Methodik einer experimentellen Ischämie und Reperfusion

Die Okklusion der linken Koronararterie ist eine gut etablierte Methode, um einen myokardialen Schaden in Ratten oder anderen Tiermodellen zu induzieren (Zaragoza *et al.*, 2011). Durch die permanente Okklusion kann die kardiale, strukturelle und funktionelle Antwort auf eine chronische myokardiale Infarktzirkulation untersucht werden (Lutgens *et al.*, 1999).

Sie kann jedoch auch reversibel als sog. *Open-Chest*-Modell durchgeführt werden (Michael *et al.*, 1995). In beiden Fällen ist sie mit einer Thorakothomie verbunden. Diese führt stets zu einer Immunantwort, die potentiell die Infarktgröße beeinflussen (Kim *et al.*, 2012) und zu einer höheren Variabilität der Ergebnisse

führen kann (Nossuli *et al.*, 2000). Wird die Ligatur in einer sog. Vor-OP nur locker um das Gefäß gelegt, und dann ein Mindestzeitraum von drei Tagen bis zur Ischämie-Induktion abgewartet, sinken TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) und IL-6 (Interleukin-6), zwei bedeutende Entzündungsfaktoren, nach einem signifikanten Anstieg durch das chirurgische Trauma auf Kontrollwerte zurück (Nossuli *et al.*, 2000). Dadurch kann, wenn im nächsten Schritt die eigentliche Ischämie ohne Eröffnung des Thorax (im sog. *Closed-Chest-Modell*) eingeleitet wird, die nachfolgende Entzündungsantwort auf den Schaden durch die Ischämie zurückgeführt und entsprechend bewertet werden.

Auch die Operationstechnik für die Vor-OP hat Einfluss auf die Ergebnisse. So stellt der Zugang zum Herzbeutel über eine laterale Thorakotomie ein alternatives und weniger invasives Modell im Vergleich zum Zugang über den medialen Thorax dar (Jong *et al.*, 2003).

Im vorliegenden Projekt wurde die Ischämie und Reperfusion anhand eines Standardprotokolls (Nossuli *et al.*, 2000) und im Anschluss an eine laterale Thorakotomie durchgeführt. Es wurde ein Zeitraum von drei Tagen zwischen der Vor-OP und der Ischämieinduktion gewählt. Als sicheres Zeichen einer erfolgreich angewandten Methodik galt eine ST-Hebung unmittelbar nach Induktion der Ischämie (Nossuli *et al.*, 2000). Außerdem konnte das Abbinden der Arterie durch ein sofort einsetzendes Erblassen des umgebenden Gewebes kontrolliert werden.

Die größte Limitation des Modells bei der Maus stellt wohl die Tatsache dar, dass die LAD ein sehr variables Verteilungsmuster aufweist (**Abbildung 41**) und aufgrund ihrer Größe auch unter dem Operationsmikroskop schwierig zu erkennen ist. Nur mittels Perfusionsversuchen kann der Verlauf genau reproduziert werden (Salto-Tellez *et al.*, 2003). Im vorliegenden Projekt wurde die LAD sehr weit proximal, unmittelbar unterhalb des linken Herzohrs, ligiert. Die gemessenen Infarktgrößen der Wildtypen sind mit denen anderer Wildtyplinen vergleichbar, weshalb davon auszugehen ist, dass die LAD korrekt abgebunden wurde.

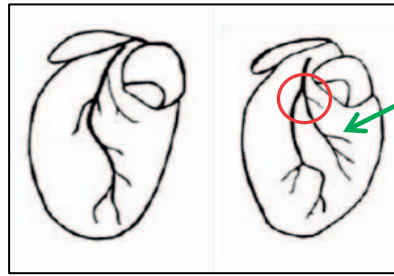


Abbildung 41: Graphische Darstellung der LAD mit zwei typischen Verteilungsmustern: Links ohne Bifurkation, rechts mit Bifurkation (rot umrandet) und abweigendem *Ramus diagonalis* (grüner Pfeil, modifiziert nach Michael *et al.*, 1995).

4.3 Diskussion der elektrophysiologischen Befunde

4.3.1 Diskussion der Arrhythmien bei *Panx1*^{+/+}- und *Panx1*^{-/-}-Mäusen

Der Auswertung der prä- und postischämischen Langzeit-EKGs (24h) von acht *Panx*^{+/+}- und zehn *Panx*^{-/-}-Tieren (postischämisch sechs und neun) lagen zwei Fragestellungen zugrunde:

1. Hat die *Panx1*-Defizienz Einfluss auf das Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystem?
2. Beeinflusst die *Panx1*-Defizienz die frühe Phase nach einer experimentell ausgelösten Ischämie?

Die Elektrokardiogramme waren sowohl prä- als auch postischämisch von guter Qualität, sodass sie fast alle für die Auswertungen herangezogen werden konnten. Postischämisch wurden die von zwei *Panx1*^{+/+}- und einem *Panx1*^{-/-}-Tier von der Analyse ausgeschlossen, da sie so deformiert waren, dass eine verlässliche Analyse nicht mehr möglich war. Herzrhythmusstörungen traten sowohl vor als auch nach der Ischämie und bei allen Tieren auf. Ein besonderes Augenmerk bei der Analyse galt den AV-Blöcken und den VES.

Durch die Ligatur der LAD wird der Zellverbund, der sonst durch diese Koronararterie und ihre abzweigenden Äste versorgt wird, geschädigt. In dem infarzierten Gewebe entsteht eine Entzündungsreaktion. Es kommt zum Verlust nekrotischer Kardiomyozyten (Bakker *et al.*, 2007) und zur exzessiven Ablagerung von Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM, Nishida *et al.*, 2008).

Dieser reparative Prozess führt im Langzeitverlauf dazu, dass noch intaktes Myokard von fibrotischen Strängen durchzogen wird (Bakker *et al.* van Rijen, 2007). Je nach Ausmaß und Verteilung kann dieses *Remodeling* eine elektrische Isolation von Kardiomyozyten herbeiführen, sodass die gezielte Weiterleitung der AP von Zelle zu Zelle nicht mehr möglich ist und z.B. die Entstehung von Arrhythmien begünstigt wird.

In den präischämischen Elektrokardiogrammen fiel auf, dass alle Versuchstiere Arrhythmien zeigten. So waren bspw. unter den *Panx1*^{+/+}-Tieren zwei Tiere, die im gesamten EKG 196 bzw. 216 VES aufwiesen, wohingegen ein anderes Tier keine einzige VES zeigte. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe bei anderen *Panx1*^{+/+}- und *Panx1*^{-/-}-Mäusen und machten sich auch in der Standardabweichung bemerkbar. Äußerlich waren alle Tiere unauffällig und zeigten keinerlei Leistungseinbußen, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um klinisch nicht-relevante Herzrhythmusstörungen handelt. Mögliche Gründe für die Arrhythmien wären die vorausgegangene Implantation der Transmitter, die Elektrodenposition, die Narkose und die Belastung durch das Handling.

Alle Tiere zeigten postischämisch eine deutliche monophasische ST-Streckenveränderung, was als Kriterium einer erfolgreich durchgeführten experimentellen Okklusion der Koronararterie und Ischämie mit anschließender Infarktbildung bewertet werden kann. Durch den akuten Infarkt kommt es an der Grenze zwischen den physiologischen und den unvollständig depolarisierten geschädigten Kardiomyozyten zu einem sog. Verletzungsstrom, da das intakte Gewebe bereits repolarisiert ist, während das geschädigte Gewebe sich noch in der Depolarisation befindet (Lüderitz in: Schaper *et al.* Gottwik, 1981). Die entstehende Potentialdifferenz verursacht eine Hebung der sonst auf der isoelektrischen Linie verlaufenden ST-Strecke. So wurde die experimentelle Ischämie bei allen Tieren erfolgreich durchgeführt.

Beide Genotypen zeigten vor und nach der Ischämie keinen signifikanten Unterschied zwischen der Häufigkeit des Auftretens von VES. Das EKG der *Panx1*^{-/-}-Tiere wies nach Ischämie signifikant mehr AV-Blöcke auf als das der *Panx1*^{+/+}-Tiere. Diese Beobachtung spricht für eine mögliche präferentielle Expression von Panx1 im Reizleitungssystem des Herzens und deutet auf eine Verzögerung der Reizweiterleitung in der Phase der Depolarisation hin. Eine

solche Verzögerung könnte zu einem erhöhten Risiko für elektrisch induziertes Vorhofflimmern (Burststimulation) beitragen, wie es von unserer Arbeitsgruppe bei *Panx1*^{-/-}-Mäusen beobachtet wurde (Petric *et al.*, 2016). Die Ergebnisse der Zeiten- und Streckenanalyse, bei der eine statistisch signifikant höhere Differenz zwischen QT- und QRS-Zeit bei den *Panx1*^{-/-}-Mäusen auffiel, weisen auf eine verzögerte Repolarisation hin. Zusammengefasst liegen daher Hinweise darauf vor, dass sowohl die De- als auch die Repolarisation in der frühen Phase nach Ischämie durch Panx1 modifiziert werden.

Auch ein durch die vorausgegangene Ischämie geschädigtes Gewebe im Bereich des AV-Knotens könnte zu einer erhöhten Anfälligkeit für die Entwicklung von AV-Blöcken beitragen. Möglicherweise greifen hier mehrere der o.g. Ursachen ineinander.

4.3.2 Diskussion der Zeiten- und Streckenanalyse

„Veränderungen des QT-Intervalls im EKG korrelieren mit dem Risiko potentiell fataler Arrhythmien, für die die Herzen transgener Mäuse ein zunehmend nützliches Modell darstellen“ (Zhang *et al.*, 2014).

Bei der EKG-Analyse der 24h-EKGs zeigte sich, dass die *Panx1*^{-/-}-Tiere gegenüber ihren *Panx1*^{+/+}-Wurfgeschwistern eine statistisch signifikant verlängerte QT_c-Zeit (p-value < 0,0001) aufwiesen. Auch die QRS-Strecke war bei den *Panx1*^{-/-}-Tieren statistisch signifikant länger als bei den *Panx1*^{+/+}-Tieren. Durch die Bestimmung der Differenz zwischen QT- und QRS-Zeit konnte im Folgenden herausgearbeitet werden, dass zwar durch die QRS-Verlängerung die Depolarisation der *Panx1*^{-/-}-Mäuse verlängert ist, darüber hinaus aber mit der Verlängerung der JT-Zeit auch die Repolarisation signifikant länger dauert. Diese Streckenverlängerungen weisen auf eine De- und Repolarisationsstörung bei *Panx1*^{-/-}-Mäusen hin. Sie unterstützen die Resultate des vorausgegangenen Projekts unserer Arbeitsgruppe, in dem Frau Stella Schulte die QT_c-Zeiten unter Avertin- und Isofluran-Narkose sowie an wachen *Panx1*^{+/+}- und *Panx1*^{-/-}-Tieren telemetrisch untersuchte. Dabei zeigten sich ebenfalls eine signifikant verlängerte QRS- sowie QT_c-Zeit (Schulte, unv. Dissertation).

Wie eingangs bereits erwähnt besitzt Panx1 eine hohe Leitfähigkeit und geringe Selektivität (Bao *et al.*, 2004). Gleichzeitig wird ihm eine Schlüsselrolle bei der Ausbreitung von Ca²⁺ zugeschrieben (**vgl. Kapitel 1.3.3.1**). Diese Ausbreitung

erfolgt auf dem schnellsten Weg über *Gap Junctions*, von denen insbesondere das Arbeitsmyokard besonders viele besitzt.

Vor diesem Hintergrund wäre bei den vorliegenden Untersuchungen zu erwarten gewesen, dass die Expression von Panx1 die Depolarisation beschleunigt, indem bspw. zusätzlich zu dem Ca^{2+} -Influx über die spannungsgesteuerten L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle ($I_{\text{Ca(L)}}$, s.u.) Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird. Dafür spräche auch, dass Panx1 sowohl durch zytoplasmatisches Ca^{2+} als auch durch ein positives Membranpotential geöffnet werden kann (Locovei *et al.*, 2006a).

In der Repolarisation findet ein genau reguliertes Zusammenspiel zwischen langsamen, spannungsgesteuerten und depolarisierenden $I_{\text{Ca(L)}}$ und den ebenfalls spannungsgesteuerten und repolarisierenden K^+ -Kanälen (langsam und schnell, I_{Ks} und I_{Kr}) statt. Beim Menschen wird das durch eine deutliche Plateauphase sichtbar (**Abbildung 42**).

Auch die Maus besitzt sowohl den depolarisierenden $I_{\text{Ca(L)}}$ als auch den schnellen I_{Kr} , zwei der langsamen Kanal-Komponenten (I_{Ks1} und I_{Ks2} ; Nerbonne, 2004) sowie den transienten schnellen $I_{\text{to,f}}$ und den langsamen $I_{\text{to,s}}$ (Xu *et al.*, 1999). Die K^+ -Kanäle tragen zur Repolarisation bei (Zhou *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999). Die Aktivierung dieser Kanäle erfolgt schnell, die Inaktivierung und „Erholung“ der langsamen Kanäle dauert jedoch lange.

Möglicherweise begünstigt Panx1 den Ca^{2+} -Einstrom als *Large Conductance Channel* (Kienitz *et al.*, 2011) und damit das Erreichen des AP-Peaks, sodass sich die repolarisierenden Kanäle schneller öffnen und „erholen“ können. Damit würde Panx1 eine Rolle für den geregelten Ablauf der Repolarisation spielen. Fehlt das Panx1, wird der Spannungs-Peak des APs verhältnismäßig langsamer erreicht und die repolarisierenden K^+ -Kanäle öffnen sich erst verzögert. Dadurch kommt es zu einer Störung der Repolarisation.

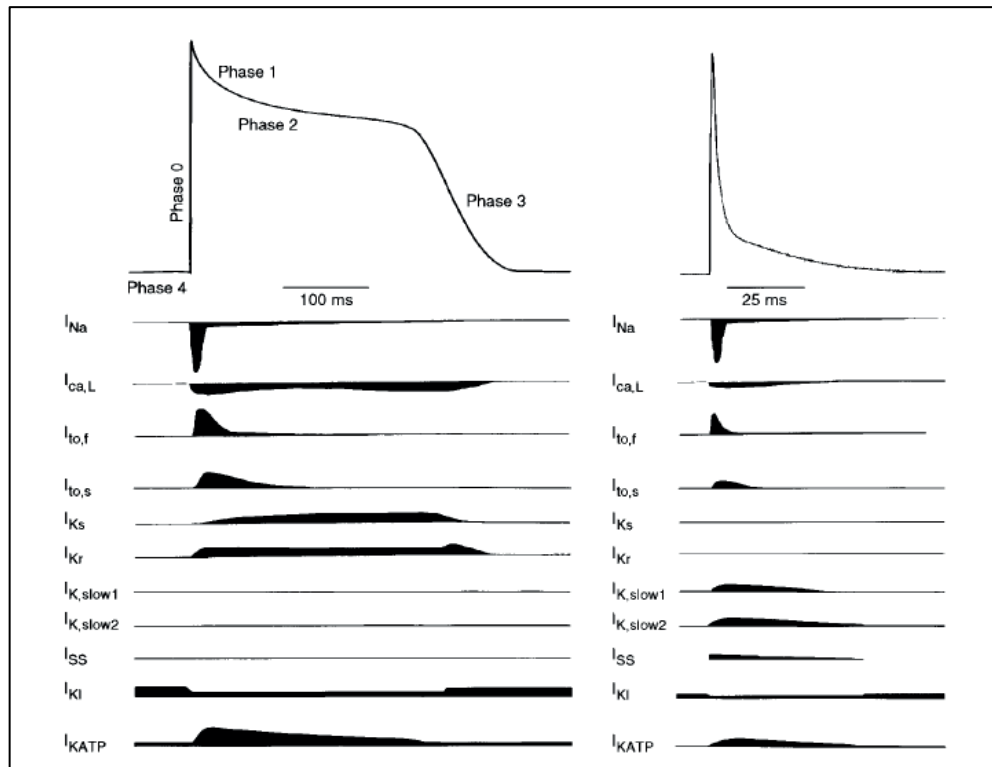


Abbildung 42: Vergleich des Aktionspotentials eines Menschen (links) mit dem einer Maus (rechts). Es wird deutlich, dass sich die Ionenflüsse trotz gleicher Kanäle in den verschiedenen Phasen des APs teilweise sehr unterschiedlich darstellen. (Modifiziert nach Nerbonne, 2004)

Anatomische oder funktionelle Auffälligkeiten am Herzen, die bei den transgenen Tieren zu einer verlängerten QT_c -Zeit führen, konnten bei der histologischen (**vgl. Kapitel 3.6**) und echokardiographischen (**vgl. Kapitel 3.3**) Untersuchung ausgeschlossen werden. Diesbezüglich wären bspw. eine Hypertrophie der Kammermuskulatur oder eine Dilatation denkbar gewesen.

Über die Antwort auf die Frage, inwiefern Panx1 mit K^+ -Kanälen interagiert, ist bisher wenig bekannt. Es wurde aber bereits nachgewiesen, dass die Untereinheit Kv β 3 der Kv-, also der spannungsgesteuerten K^+ -Kanäle, mit Panx1 interagiert und seine Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen von Redoxpotentialen reduziert (Bunse *et al.*, 2009). Vor diesem Hintergrund sind auch andere bisher unentdeckte Interaktionen von Panx1 mit Proteinuntereinheiten der K^+ -Kanäle denkbar, die den Ablauf der Repolarisation oder des gesamten APs beeinflussen können.

Zukünftig könnten Genexpressionsanalysen, immunhistochemische Untersuchungen und *Patch Clamp*-Experimente weitere Aufschlüsse geben.

4.3.3 Diskussion der *Heart Rate Variability* im Rahmen der Ischämie und Reperfusion in *Panx1^{+/-}*- und *Panx1^{-/-}*-Mäusen

An einem gesunden Herzen passt das Autonome Nervensystem (ANS) die Kontraktilität und die Herzfrequenz und damit das Herzzeitvolumen den aktuellen Anforderungen des Organismus an. Es kontrolliert die elektrischen Fähigkeiten von Schrittmacherzellen, indem es auf Ionenkanäle wirkt, die die Automtizität des Sinusknotens modifizieren (Couette *et al.*, 2006).

Nach einem Myokardinfarkt verringert sich diese Anpassungsfähigkeit, was sich in einer reduzierten HRV widerspiegelt. Die autonomen Einflüsse geraten aus dem Gleichgewicht: Der Vagotonus sinkt und/ oder der Sympathotonus steigt kompensatorisch an, um das Herzzeitvolumen aufrecht zu erhalten. Ausgehend davon wurde in den vergangenen Jahrzehnten in zahlreichen Studien nachgewiesen, dass eine reduzierte HRV nach Infarkt mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko korreliert (u.a. Kleiger *et al.*, 1987; La Rovere *et al.*, 2003; Erdogan *et al.*, 2008).

Im vorliegenden Projekt wurde die *Heart Rate Variability* sowohl prä- als auch postischämisch untersucht, um die physiologischen Parameter der Tiere, die Veränderungen durch den Myokardinfarkt und eventuelle Unterschiede zwischen den Genotypen aufzuzeigen.

Während die Bestimmung der HRV-Parameter beim Menschen inzwischen zu den Standardverfahren gehört, erweist sich die Standardisierung dieser Analyse bei Mäusen nach wie vor als schwierig. Dies liegt vor allem an der hohen Herzfrequenz und dem oft instabilen Signal bei der Aufzeichnung, z.B. durch Bewegungsartefakte (Thireau *et al.*, 2008). Solche Faktoren erschweren die Interpretation und Bewertung der Ergebnisse.

Auch existieren für die HRV-Messung bei der Maus bis heute keine Guidelines, wie sie 1996 für die Berechnung beim Menschen etabliert wurden (Malik *et al.*, 1996). Dadurch wird die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert. Weiterhin haben Schwankungen des arteriellen Blutdrucks und die Atembewegungen Einfluss auf die Parameter der HRV. Auch die Interpretierbarkeit der einzelnen Parameter der HRV muss nach wie vor kritisch betrachtet werden. In diesem Zusammenhang steht insbesondere die *Low Frequency* immer wieder im Fokus kontroverser Diskussionen. Bereits Malik *et al.* beschrieben 1996 in ihren Empfehlungen für die HRV-Analyse, dass bzgl. der Interpretation der LF-

Komponente noch keine abschließende Beurteilung möglich sei. Aus einigen Studien ginge demnach die Betrachtung der LF als quantitativer Marker für sympathische Modulationen hervor, andere wiederum hätten gezeigt, dass die LF sowohl sympathische als auch vagale Aktivität reflektiert (Malik *et al.*, 1996). In der Zwischenzeit ist die Bedeutung der LF-Komponente viel diskutiert worden (Goldstein *et al.*, 2011). Erst kürzlich wurde erneut im Tiermodell bestätigt, dass die *Low Frequency* weder als Maß für den Sympathotonus noch als solches für den Baroreflex betrachtet werden kann (Martelli *et al.*, 2014). Es bleibt also schwierig, die LF-Komponente der *Frequency Domain* korrelierenden physiologischen bzw. pathologischen Prozessen im Individuum zuzuordnen.

Unsere Versuchstiere zeigten beim Vergleich der post- mit den präischämischen Ergebnissen eine statistisch signifikante Verschlechterung der HRV. Dies galt für beide Genotypen. Den Tierart-bezogenen Empfehlungen (Thireau *et al.*, 2008) folgend wurde zwischen der Transmitter-Implantation und der ersten HRV-Analyse ein Habituations-Zeitraum von zehn Tagen eingehalten. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die präischämischen Werte der Tiere nicht durch die vorausgegangene Narkose moduliert waren. Die postischämische Verschlechterung der Parameter ist folglich als Bestätigung einer erfolgreich durchgeführten Ischämie und Reperfusion zu betrachten und lässt erkennen, dass sie bei allen Tieren zu einer reduzierten globalen Herzfrequenzvariabilität geführt hat.

Unter physiologischen Bedingungen wirkt der Parasympathikus am Herzen über die Bindung von Acetylcholin an muscarinergen Rezeptoren und die nachfolgende Aktivierung von K^+ -Kanälen ($I_{K(ACH)}$). Es kommt zu einem gesteigerten K^+ -Ausstrom und der K^+ - und Ca^{2+} -Einstrom nehmen ab, wodurch die Zelle hyperpolarisiert und eine Depolarisation erschwert wird. Am Sinusknoten hat dies eine negativ chronotrope Wirkung zur Folge, auf den AV-Knoten wirkt sich die Kanalaktivierung negativ dromotrop aus und verlangsamt die Weiterleitung des APs.

Durch die Ischämie und den damit verbundenen funktionellen Schaden nehmen sympathische Einflüsse zu. So muss bspw. dem reduzierten Schlagvolumen mit einer Erhöhung der Herzfrequenz regulatorisch entgegengewirkt werden. Dies zeigte sich in der Analyse u.a. in dem signifikant kürzeren mittleren RR-Intervall aller Tiere. Gleichzeitig nehmen parasympathische Einflüsse ab, was durch die

signifikant verminderten Werte des RMSSD und NN6 verdeutlicht wurde. Gleiches galt für die frequenzbasierte Analyse: Die Gesamtleistung auf allen Frequenzbändern nahm ab, was ebenfalls mit der Beobachtung einer geringeren Gesamtvariabilität im Einklang steht. Beim Vergleich der Genotypen miteinander konnten sowohl prä- als auch postischämisch keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Ob *Panx1* exprimiert wird, scheint also keinen Einfluss auf die Anpassungsfähigkeit des Herzens und deren Veränderung durch einen Myokardinfarkt zu haben.

4.3.4 Diskussion der *Heart Rate Turbulence*

Die *Heart Rate Turbulence*, die den initialen Herzfrequenzanstieg nach einer VES (TO) und den anschließenden Abfall auf die Ausgangswerte (TS) beschreibt, gilt als indirektes Maß für den Barorezeptorreflex. Sie reflektiert damit die komplexe Interaktion von Sympathikus und Parasympathikus, die insbesondere nach einem Myokardinfarkt reduziert sein kann. Diese Funktionseinschränkung der autonomen Anpassungsfähigkeit hat einen hohen prognostischen Wert (Bauer *et al.*, 2006), weshalb die HRT in der Klinik als einer der potentesten unabhängigen Marker für das Sterblichkeitsrisiko nach Myokardinfarkt herangezogen wird (Bauer *et al.*, 2008).

Während die Standards für die HRT-Messung beim Menschen klar definiert sind (Bauer *et al.*, 2008), liegen seit der erstmaligen Beschreibung der Messung im Rahmen des Mausmodells (Mersmann *et al.*, 2010) wenige weitere Studien vor, die die murinen HRT-Parameter und deren Veränderung durch äußere Einflüsse beschreiben. Es bleibt daher fraglich, ob die existierenden Grenzwerte für den Menschen direkt auf das Mausmodell übertragbar sind (s.u., Stöckigt *et al.*, 2014). Demzufolge erwies sich die Beurteilung der Ergebnisse im vorliegenden Projekt als schwierig, sodass ein Vergleich von post- und präischämischen Werten von großem Vorteil gewesen wäre. Ein solcher Vergleich war nicht möglich, da die Tiere präischämisch gar keine oder zu wenige spontane VES aufwiesen. Um eine verlässliche Aussage treffen zu können, sollten jedoch > 5 VES pro Tier mit in die Analyse einfließen (Bauer *et al.*, 2008).

So wurden die HRT-Parameter nur nach künstlicher Herbeiführung eines Myokardinfarktes bestimmt, um zu überprüfen, ob die Deletion von *Panx1* einen Einfluss auf die HRT-Werte und damit auf den Barorezeptorreflex hat. Dabei-

wiesen die beiden untersuchten Genotypen keine statistisch signifikanten Unterschiede auf. Es bleibt also fraglich, ob der initiale Herzfrequenzanstieg und damit die sympathische Gegenregulation bei den *Panx1^{+/-}*-Tieren postischämisch besser funktioniert als bei *Panx1^{-/-}*-Mäusen.

Hinzu kam eine Auffälligkeit, die sich bei der Berechnung des TO bei beiden Genotypen auftrat. Die Formel für den TO beim Menschen bezieht sich auf die beiden RR-Abstände vor dem Kopplungsintervall (RR₂ und RR₁) und die beiden RR-Abstände nach der kompensatorischen Pause (RR₁ und RR₂). Letztere sollen bei adäquatem Baroreflex verhältnismäßig kürzer sein und somit die frühe Beschleunigung der Herzfrequenz widerspiegeln. Jedoch zeigte sich im vorliegenden Projekt bei vier von sechs *Panx1^{+/-}*- und sechs von acht *Panx1^{-/-}*-Tieren, dass erst das Intervall RR₃ kürzer war als die beiden vorausgegangenen RR-Intervalle. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Blutdruck hier langsamer abfiel, sodass es erst bei der dritten Herzaktion nach der VES zu dem bereits beschriebenen Trigger-Effekt und der sympathischen Gegenregulation mit der *Early Acceleration*, also einer Herzfrequenz-Erhöhung, kam.

Um dies zu überprüfen, wurde neben der Bestimmung der HRT wie oben beschrieben eine weitere Analyse durchgeführt, bei der anstelle des RR₁ und RR₂ das Intervall zwischen RR₂ und RR₃ in die Berechnungsformel eingesetzt wurde. Der Vergleich mit der ursprünglichen Analyse zeigte jedoch keine Unterschiede.

Die genauen Mechanismen, die der HRT zugrunde liegen, sind immer noch nicht vollständig erforscht (Bauer *et al.*, 2006). Die Widerspiegelung der Baroreflexsensibilität erscheint jedoch unter physiologischen Gesichtspunkten plausibel. Da die HRT in einem direkten Zusammenhang mit der HRV steht, wird sie über den Barorezeptorreflex hinaus auch mit der gesamten autonomen Variabilität in Verbindung gebracht. So korrelieren bspw. die Herzfrequenz (mittleres RR-Intervall) und der TS miteinander: Eine höhere Herzfrequenz (kürzeres RR-Intervall) prädisponiert für einen niedrigeren TS, da die Reaktionsfähigkeit des Sinusknotens auf Veränderungen des Blutdrucks durch eine VES reduziert wird.

Aus diesem Grund kann ein Vergleich des TS nur bei ähnlichen mittleren Herzfrequenzen stattfinden (Cygankiewicz *et al.*, 2004), was bei den verwendeten Gruppen gegeben war. Auch hier korrelierten die postischämisch erhöhten

Herzfrequenzen mit einem niedrigeren TS. Alle Tiere zeigten einen TS < 2,5ms/RR-Intervall, was einer ausbleibenden Verlangsamung der HR und damit einer schlechten Normalisierung der Baroreflexantwort nach einer VES entspricht. Es ist also davon auszugehen, dass der künstlich herbeigeführte Myokardinfarkt unabhängig vom Genotyp der Mäuse zu einer reduzierten HRT geführt hat. Ob die Expression von *Panx1* eine Rolle spielt, kann in diesem Zusammenhang nicht endgültig geklärt werden.

Im vorliegenden Projekt fand die HRT-Analyse basierend auf einem 24h-EKG statt, das unmittelbar in Anschluss an die Ischämie aufgezeichnet worden war. Für zukünftige Studien an der *Panx1*^{-/-}-Maus wäre eine Untersuchung der zeitlichen Entwicklung der Parameter nach einem Myokardinfarkt und damit die Frage nach einer Beeinflussung durch Heilungsprozesse von Interesse. Auch die Einwirkung eines höheren Alters der Mäuse könnte neue Erkenntnisse erbringen. Beim Menschen wird ein zunehmendes Alter mit einer schlechteren HRT assoziiert (Schwab *et al.*, 2005).

Die HRT-Messung hat sich in zahlreichen Studien am Menschen als verlässliche Methode zur Risikostratifizierung nach einem Myokardinfarkt bewiesen (u.a. Ghuran *et al.*, 2002; Barthel *et al.*, 2003; Bauer *et al.*, 2006). Im Tierexperiment an der Maus stellen jedoch nicht nur die hohe Herzfrequenz oder das Nichtvorhandensein präischämischer Daten eine Hürde dar: Erst kürzlich bestätigten Stöckigt *et al.* in einer Studie, dass sich eine HRT-Messung bei der Maus zwar gut durchführen lässt, dass jedoch der TO und das Kopplungsintervall invers korrelieren, was insbesondere bei künstlich stimulierten VES (*Pacing*) eine Rolle spielt (Stöckigt *et al.*, 2014).

Wie gut und unter welchen Gesichtspunkten sich die so gewonnenen Erkenntnisse also tatsächlich vom Menschen auf die Maus und umgekehrt übertragen lassen, kann zukünftig erst durch weitere Studien am Mausmodell eruiert werden.

4.4 Diskussion der hämodynamischen Befunde

4.4.1 Echokardiographie

Die echokardiographische Untersuchung fand anhand eines standardisierten Untersuchungsprotokolls nach Collins (Collins *et al.*, 2003) statt, um möglichst gut vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Hierzu gehörte u.a., dass zwischen der Echokardiographie und der Ischämie-Induktion und auch zwischen letzterer und einer weiteren postischämischen Echokardiographie jeweils mindestens 24h Zeitabstand eingehalten wurde. Diese Pause sollte mögliche Einflüsse auf den Schaden durch die Ischämie, hervorgerufen durch eine Prä- bzw. Postkonditionierung mittels Isoflurannarkose während der Echokardiographie, ausschließen (Redel *et al.*, 2009). Alle Tiere zeigten vor der Ischämie-Induktion eine mit anderen C57BL/6-Wildtypen vergleichbare physiologische LV-Funktion (Pachon *et al.*, 2015; Stypmann *et al.*, 2007; Stypmann *et al.*, 2009). Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen.

Die transthorakale echokardiographische Untersuchung dient als exzellente und nicht-invasive Methode, um die Veränderungen der linksventrikulären Geometrie und Funktion nach Ischämie *in vivo* zu beurteilen (Gao *et al.*, 2000). Gleichzeitig stellen die Anatomie und die physiologischen Parameter der Maus als Versuchstier für den Untersucher eine Herausforderung dar. Umso größer ist die Bedeutung einer in dieser Versuchsreihe verwendeten Standarduntersuchung nach Collins (Collins *et al.*, 2003) sowie die Tatsache, dass alle Versuchstiere von der gleichen Person geschallt wurden. Diese Voraussetzungen gewährleisteten eine optimale Vergleichbarkeit und Verlässlichkeit der Ergebnisse.

Ein Vergleich der Genotypen untereinander zeigte keine signifikanten Unterschiede, was darauf hindeutet, dass *Panx1* keinen echokardiographisch erfassbaren Einfluss auf die linksventrikuläre Funktion hat, und durch die Beobachtungen bei der Katheter-Untersuchung (**vgl. Kapitel 3.4**) gestützt wird. Außerdem deuten die Ergebnisse der präischämischen echokardiographischen Untersuchung darauf hin, dass die Herzmorphologie der *Panx1*^{-/-}-Tieren keine strukturellen Anomalien aufweist, die die bei der EKG-Analyse vor Ischämie festgestellte Verlängerung der QT_c-Zeit bedingen könnten.

Die Ischämie und der damit verbundene Gewebsschaden führen, je nach Loka-

lisation und Ausmaß, zu einer Störung des funktionellen Synzytiums der Herzmuskelzellen. Dies hat zur Folge, dass die Erregungsbildung und –weiterleitung nicht mehr adäquat erfolgen kann, was sich echokardiographisch anhand schlechterer Funktionsparameter darstellen lässt.

So zeigten alle Tiere 24h nach der Ischämie, in der akuten Reperfusionsphase, eine signifikante Verschlechterung der linksventrikulären Funktionswerte. Dies kann als Qualitätsmerkmal der verwendeten Methode und Zeichen eines erfolgreich ausgelösten Infarkts betrachtet werden. Die kardiale Funktion verminderte sich bei beiden Genotypen nach Ischämie ähnlich signifikant.

Eine Verschlechterung der Funktionswerte wie bspw. der EF hat in der Klinik prognostische Bedeutung. Jedoch wurde nachgewiesen, dass die EF sich insbesondere innerhalb der ersten zwei Wochen nach dem Myokardinfarkt durch *Remodeling*-Vorgänge wieder verbessert (Solomon *et al.*, 2001) und dass auch der Zeitraum zwischen dem Infarktgeschehen und der Reperfusion des infarzierten Gefäßes für die linksventrikuläre Funktion von Infarkt-Patienten eine große Rolle spielt (Sheiban *et al.*, 2001). Vor diesem Hintergrund wäre eine klare Entscheidung hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft einer verschlechterten Ejektionsfraktion nur nach erneuter Echokardiographie 14 Tage oder später nach Ischämie möglich.

Bei normaler Funktion des linken Ventrikels sollte die E-Welle, die die passive Füllung des linken Ventrikels durch die frühdiastolische Relaxation beschreibt, eine höhere Geschwindigkeit aufweisen als die A-Welle. Diese entspricht dem spätdiastolischen aktiven Einstrom durch die Vorhofkontraktion. Eine diastolische Dysfunktion geht im Frühstadium mit einer Störung der Ventrikel-Relaxation einher und verschiebt dadurch das Gleichgewicht durch eine niedrigere Geschwindigkeit der E-Welle in Richtung eines größeren Quotienten. Die Geschwindigkeit der E-Welle sank bei beiden Genotypen statistisch signifikant ab (*Panx1*^{+/+}-Tiere: p-value 0,0066**, *Panx1*^{-/-}-Tiere: p-value 0,0216*). Da es jedoch parallel hierzu auch zu einem Absinken der A-Wellen-Geschwindigkeit kam, schlug sich dies nicht als statistisch signifikante Verschiebung des Quotienten nieder. Die Beobachtungen weisen jedoch bei beiden Genotypen auf eine nach Ischämie verminderte systolische und diastolische Funktion hin und stehen damit im Einklang mit den Ergebnissen der Untersuchung mit dem Druck-Volumen-Katheter.

4.4.2 Diskussion der Untersuchungen mit dem Druck-Volumen-Katheter

Die intravasale und intrakardiale Druck- und Volumenmessung mit dem sog. Mikro-Tip-Katheter trägt durch ihre hohe Präzision und Genauigkeit zur Messung der isovolumetrischen Kennzahlen kardialer Kontraktilität bei (Lorenz *et al.*, 1997). Im vorliegenden Projekt wurde diese Untersuchung durchgeführt, um die Funktionsparameter vor und nach der Ischämie zu bestimmen und zwischen *Panx1*^{+/+}- und *Panx1*^{-/-}-Tieren zu vergleichen. Die so erhobenen hämodynamischen Messwerte ergänzen damit die der Bildgebung mittels Echokardiographie.

Panx1 trägt über eine Kolokalisation und Interaktion mit dem α 1D-adrenergen Rezeptor zur Blutdruckregulation in den kleinen Widerstandsgefäßen bei (Billaud *et al.*, 2011). Abweichungen der Blutdruckwerte zwischen den Genotypen wären basierend auf diesen Beobachtungen denkbar gewesen, konnten aber im vorliegenden Projekt nicht bestätigt werden.

Vermutlich hat die *Panx1*-vermittelte Blutdruckregulation überwiegend lokale Effekte und wirkt sich nicht auf den Gesamtblutdruck aus. Der systolische (P_{\max}) und diastolische (P_{\min}) Druck in der Aorta war bei beiden Genotypen im Vergleich zu physiologischen Werten bei der Maus reduziert (Wolfensohn *et al.*, 2003), was zum einen auf die Allgemeinanästhesie zurückzuführen ist, zum anderen auch mit der zuvor durchgeführten Ischämie und einer dadurch reduzierten Fähigkeit der Blutdruckregulation zusammenhängen kann. Auch die übrigen Messwerte waren im Vergleich zu physiologischen Daten in gleicher Narkose schlechter (Pacher *et al.*, 2008; Abraham *et al.*, 2015) und spiegeln den funktionellen Schaden durch die Ischämie wider. Die mittlere Herzfrequenz war als einziger Messwert gegenüber den o.g. physiologischen Durchschnittswerten unter gleicher Narkose erhöht, was auf eine Kompensation des reduzierten Blutdrucks durch eine erhöhte Herzfrequenz hinweist.

Zuletzt wurde eine intraperitoneale Perfusion mit Noradrenalin durchgeführt, um zu überprüfen, ob bei beiden Genotypen trotz des Ischämieschadens noch eine adäquate Antwort auf adrenerge Stimulation gegeben ist und ob und wie sich diese unterscheidet. Die *Panx1*^{+/+}- und *Panx1*^{-/-}-Mäuse zeigten nach der Verabreichung von Noradrenalin eine signifikant bessere systolische Druckentwicklung und einen höheren endsystolischen Druck im linken Ventrikel. Die Druck-

entwicklung war vergleichbar mit Referenzwerten anderer Autoren (Pacher *et al.*, 2008; Abraham *et al.*, 2015), der endsystolische Druck lag jedoch auch nach der Wirkung von Noradrenalin noch unter den Durchschnittswerten anderer Tiere in gleicher Narkose, ohne vorausgegangene Ischämie (Pacher *et al.*, 2008). Die Ansprechbarkeit myokardialer α - und β -Adrenozeptoren auf Noradrenalin wurde offensichtlich durch die vorausgegangene Ischämie beeinträchtigt. *Panx1* scheint jedoch keinen Einfluss auf die durch die adrenerge Wirkung hervorgerufene Steigerung des Ca^{2+} -Stroms oder die Sensitivität der Myofilamente für Ca^{2+} , das dort an Troponin bindet und so zur kontraktiven Aktivierung von Aktomyosin führt (Prasad *et al.*, 2012), zu haben.

4.5 Diskussion der Infarktplanimetrie

Bei neurobiologischen Untersuchungen führte eine permanente Okklusion der *A. cerebri media* in *Panx1*^{-/-}*Panx2*^{-/-}-Mäusen zu kleineren Infarkten und einem geringeren neurologischen Folgeschaden im Vergleich zu Wildtypen und Einfach-Knockout-Tieren (Bargiotas *et al.*, 2011).

Vor diesem Hintergrund wurde im vorliegenden Projekt nach der experimentellen Ischämie und Reperfusion eine Infarktplanimetrie der Mäuseherzen durchgeführt, um zu überprüfen, ob *Panx1* unter den oben aufgeführten experimentellen Bedingungen auch kardial einen Einfluss auf die Infarktgröße hat. Hierbei gilt die TTC-Färbung für die Größenbestimmung bis heute als Methode der Wahl (u.a. Fisher *et al.*, 2002; Redfors *et al.*, 2012). Das Ausmaß der Färbung korreliert mit der Anzahl intakter Mitochondrien (Ferrera *et al.*, 1993) und repräsentiert damit die Zellvitalität. In Kombination mit der *Evans Blue*-Färbung lassen sich so das Infarktareal und die *Area At Risk* gut bestimmen und vom umliegenden gesunden Gewebe abgrenzen.

Die Infarktbestimmung kann flächen- oder längenbasiert erfolgen (Takagawa *et al.*, 2007). Da die Bemessung der Flächen bzw. Längen manuell durchgeführt wird, bergen diese Methoden jedoch auch das Risiko, sehr subjektive und schlecht vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Umso wichtiger ist es, wie im vorliegenden Projekt nach einem standardisierten Protokoll (Michael *et al.*, 1995) vorzugehen. Auch die Anzahl der verwendeten Herzschnitte pro Tier trägt zu einem besser reproduzierbaren Ergebnis bei (Takagawa *et al.*, 2007), weshalb alle Herzschnitte für die Infarktgrößenmessung verwendet wurden.

Aufgrund des unterschiedlichen Verteilungsmusters der LAD in C57BL6/J-Mäusen (Salto-Tellez *et al.*, 2003; **Abbildung 41**) die den genetischen Hintergrund der *Panx1*^{-/-}-Tiere bilden, ist auch die korrekte Positionierung der Ligatur eine Herausforderung. Je nach Position der Ligatur variieren die Infarktgröße, funktionelle Einschränkungen und die Überlebensrate der Tiere deutlich (Degabriele *et al.*, 2004). Daher wurde die Ligatur im vorliegenden Projekt unmittelbar unterhalb des linken Vorhofs gesetzt, was einen „höchst reproduzierbaren Bereich und Umfang des Infarktes“ erlaubt (Salto-Tellez *et al.*, 2003).

Die ermittelten Infarktgrößen der *Panx1*^{+/-}-Tiere standen im Einklang mit den zu erwartenden Infarktgrößen bei Wildtypen (Michael *et al.*, 1995), was als Qualitätsmerkmal der verwendeten Methode bewertet werden kann.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Infarktgrößen von *Panx1*^{+/-}- und *Panx1*^{-/-}-Mäusen festgestellt werden. Dies galt auch für die *Area At Risk*. Unsere Beobachtungen weichen damit von denen, die unter neurobiologischen Gesichtspunkten gemacht wurden, ab. Offensichtlich hat *Panx1* trotz seiner bekannten Funktion im Rahmen von Ischämie, Inflammation und Apoptose unter den von uns gewählten experimentellen Bedingungen keinen Einfluss auf die Größe eines Herzinfarktes. Als möglicher Grund hierfür hierfür käme infrage, dass im Falle der Ausschaltung von *Panx1* ein anderes Gen kompensatorisch hochreguliert wird, und zum Infarktgeschehen beiträgt. Ein solcher Kompensationsmechanismus wurde bereits bei der o.g. Studie diskutiert (Bargiotas *et al.*, 2011).

4.6 Diskussion der histologischen Befunde

Strukturelle Veränderungen der Herzmorphologie begünstigen die Entstehung funktioneller Störungen. Vermehrte bindegewebige Ablagerungen zwischen den Kardiomyozyten können die elektromechanische Kopplung behindern. Diese Fibrosierung kann als Folge eines Myokardinfarktes auftreten (**vgl. Kapitel 4.3.1**) und ist eine der Ursachen für Herzversagen, das finale Stadium kardialer Erkrankungen (Nishida *et al.*, 2008).

Als großer und unselektiver Ionenkanal (Qiu *et al.*, 2009) stellt *Panx1* einen Transferweg für kleine Signalmoleküle wie Ca^{2+} (Vanden Abeele *et al.*, 2006) und ATP dar und interagiert mit dem P2X7-Rezeptor (Pelegriin *et al.*, 2006). Hohe Ca^{2+} -Konzentrationen führen zum Zelltod (Nicotera *et al.*, 1994).

und apoptotische Zellen setzen über Panx1 sog. „*Find-me*“-Signale frei, die Phagozyten anlocken (Chekeni *et al.*, 2010). Wird ATP in den EZR freigesetzt, kann dies ein physiologischer Prozess zur interzellulären Kommunikation sein, jedoch auch den Zelltod begünstigen (D'hondt *et al.*, 2011). Die Aktivierung von P2X7 fördert die Freisetzung von biologisch aktivem IL-1 β (Hanley *et al.*, 2012). Damit spielt Panx1 eine funktionelle Rolle in elementaren Prozessen wie Apoptose, Entzündungen und Infektionen (Shestopalov *et Panchin*, 2008) sowie Fibrosierung (Nishida *et al.*, 2008, s.u.).

Bei Versuchen, in denen im Mausmodell experimentell durch eine transaortale Konstriktion eine Druckbelastung des Herzens ausgelöst wurde, führte ATP-Freisetzung aus Pannexin-Kanälen über dessen Bindung an P2Y6 zur Aktivierung von G α 12/13-Proteinen. Diese G-Proteine induzieren über den Rho-Signalweg die Transkription fibrogenetischer Gene wie TGF- β , Periostin und Prokollagen Typ I und III. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde postuliert, dass eine Druckbelastung des Herzens über die Aktivierung von Panx1 eine kardiale Fibrose vermittelt (Nishida *et al.*, 2008).

Es wäre also denkbar, dass die Expression von Panx1 auch bei kurzzeitig vermehrter Druckbelastung des Herzens, z.B. durch eine stressvermittelte Steigerung des Sympathotonus, die Entstehung einer kardialen Fibrose begünstigt und sich dies vor allem in den Vorhöfen, wo Panx1 signifikant höher exprimiert wird als in den Ventrikeln (Petric *et al.*, 2016), histologisch nachweisen lässt.

Basierend auf diesen Beobachtungen wurden in Vorversuchen der Arbeitsgruppe bereits histopathologische Untersuchungen von Herzen *Panx1*^{+/+}- und *Panx1*^{-/-}-Tiere durchgeführt, bei denen die Dicke der Ventrikelwand, die Länge der kardialen Myozyten und das Ausmaß einer evtl. Fibrose quantifiziert wurde. Es konnten keine signifikanten qualitativen Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden (Petric *et al.*, 2016).

Um diese Ergebnisse nochmals zu untermauern, wurden im vorliegenden Projekt ebenfalls Paraffinschnitte der Herzen angefertigt und lichtmikroskopisch untersucht. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen *Panx1*^{+/+}- und *Panx1*^{-/-}-Mäusen aufgezeigt werden. Offensichtlich hat die Expression von Panx1 im Falle kurzzeitiger Druckbelastungen des Herzens keinen Einfluss auf die Ausbildung einer Fibrose.

4.7 Ausblick

Im vorliegenden Projekt wurde die Rolle von Panx1 in einem akuten murinen myokardialen Modell der Ischämie und Reperfusion untersucht. Hieraus ergaben sich bei den elektrophysiologischen Untersuchungen Hinweise auf eine De- und Repolarisationsstörung bei *Panx1*-Defizienz. Zukünftig wäre ein chronisches Modell im Sinne einer Untersuchung der frühen Reperfusionsphase bis 7 Tage nach dem Infarktgeschehen von Interesse. *Remodeling*-Prozesse, die zur Bildung eines fibrotischen Narbengewebes (de Bakker *et al.* Rijen 2007) und zu Veränderungen der kardialen Elektrophysiologie führen (Pinto *et al.*, 1999), könnten so genauer untersucht werden.

Möglicherweise zeigen sich Unterschiede zwischen den Genotypen erst zu einem späteren Zeitpunkt nach der Ischämie. Da Panx1 mit der Initiierung einer Fibrose (Nishida *et al.*, 2008) und dem Zelltod (Locovei *et al.*, 2007) in Verbindung gebracht wird und die Fibrosierung nach Myokardinfarkt auch nicht-infarziertes Gewebe betrifft (Weber *et al.*, 1996), wäre bspw. die Entwicklung einer größeren Infarktzone bei den *Panx1*^{-/-}-Tieren denkbar.

Auch eine Untersuchung mittels Burststimulation nach Ischämie, also ein Katheter-induziertes Auslösen von Vorhofflimmern, könnte weitere Aufschlüsse über den Einfluss von Panx-1 auf die kardiale Elektrophysiologie geben. Bei Versuchen unserer Arbeitsgruppe mit Tieren, an deren Herzen zuvor keine Ischämie ausgelöst worden war, zeigten die *Panx1*^{-/-}-Tiere eine signifikant höhere Anfälligkeit für atriales Flimmern (Petric *et al.*, 2016).

Im Rahmen immunhistochemischer Analysen könnte zukünftig die Expression von Panx1 im Myokard oder sogar innerhalb einzelner Myozyten noch besser untersucht und die Rolle des Proteins bei der Impulsbildung und –weiterleitung im Herzen genauer definiert werden. Genexpressionsanalysen unter Verwendung von *Gene Expression Arrays* könnten dazu dienen, eine kompensatorische Hochregulation anderer Gene bei den *Panx1*^{-/-}-Tieren, die eventuelle Unterschiede zwischen den Genotypen maskieren, aufzudecken.

In diesem Zusammenhang wäre auch die Untersuchung der Expressionsmuster von K⁺- oder anderen Ionenkanälen und einer möglichen Interaktion mit Panx1 interessant. Mittels *Patch-Clamp*-Untersuchungen könnten mögliche Ionenströme an der Zellmembran einzelner Kardiomyozyten dargestellt werden. Weiterhin kämen gewebespezifische Knockout-Tiere infrage, um die kardiale Funk-

tion des Proteins genauer zu beleuchten. Aufgrund der nachgewiesenen Koexpression von *Panx1* und *Panx3* in anderen Geweben (Penuela *et al.*, 2007; Penuela *et al.*, 2008) könnte so z.B. eine Koexpression und gegenseitige Beeinflussung der beiden Proteine am Herzen endgültig ausgeschlossen werden.

Trotz einer Verbindung zwischen *Panx1* und der Pathogenese diverser Krankheiten konnten bis heute keine Keimbahn-Mutationen nachgewiesen und mit dem Ionenkanal in Verbindung gebracht werden (Penuela *et al.*, 2014). Die Tatsache, dass zu 94% eine konservierte Sequenzhomologie zwischen humanem und murinem *Panx1* herrscht (Penuela *et al.*, 2009), deutet dennoch darauf hin, dass sich die Beobachtungen in Mäusen auf den Menschen übertragen lassen. Dies wird für zukünftige Studien, insbesondere im Hinblick auf die Pathogenese des Vorhofflimmerns und des myokardialen Schadens nach einem Infarkt beim Menschen, von Bedeutung sein.

5 Literaturverzeichnis

Abraham, D.; Mao, L. (2015):

Cardiac pressure-volume loop analysis using conductance catheters in mice.

In: J. Vis. Exp. (103), e52942

Ahne, W. (2007):

Tierversuche: Im Spannungsfeld von Praxis und Bioethik.

In: 1. Auflage, Buchtitel, S.35, Schattauer-Verlag

Anselmi, F.; Hernandez, V.H.; Crispino, G.; Seydel, A.; Ortolano, S.; Roper, S.D.; Kessaris, N.; Richardson, W.; Rickheit, G.; Filippov, M.A.; Monyer, H.; Mammano, F. (2008):

ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca^{2+} signals across the inner ear.

In: Proc. Natl. Acad. Sci. 105(48):18770-75

Arastéh, K.; Baenkler, H.-W.; Bieber, C.; Chatterjee, T. (2009):

Duale Reihe Innere Medizin

In: 2. Auflage, S.27; 58; 87ff., Thieme-Verlag

Ashcroft, F.M. (2006):

From molecule to malady.

In: Nature 440(7083):440-7

Bao, L.; Locovei, S.; Dahl, G. (2004):

Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP.

In: FEBS Lett. 572(1-3):65-68

Baranova, A.; Ivanov, D.; Petrash, N.; Pestova, A.; Skoblov, M.; Kelmanson, I.; Shagin, D.; Nazarenko, S.; Geraymovych, E.; Litvin, O.; Tiunova, A.; Born, T.L.; Usman, N.; Staroverov, D.; Lukyanov, S.; Panchin, Y. (2004):

The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins.

In: Genomics 83(4):706-16

Barbe, M.T.; Monyer, H.; Bruzzone, R. (2006):

Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels.

In: Physiology 21(2):103-14

Bargiotas, P.; Krenz, A.; Hormuzdi, S.G.; Ridder, D.A.; Herb, A.; Barakat, W.; Penuela, S.; von Engelhardt, J.; Monyer, H.; Schwaninger, M. (2011):

Pannexins in ischemia-induced neurodegeneration.

In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108(51):20772-77

Barthel, P.; Schneider, R.; Bauer, A.; Ulm, K.; Schmitt, C.; Schömig, A.; Schmidt, G. (2003):

Risk stratification after acute myocardial infarction by heart rate turbulence.

In: Circulation 108(10):1221-26

Bauer, A.; Malik, M.; Barthel, P.; Schneider, R.; Watanabe, M.A.; Camm, A. J.; Schömig, A.; Schmidt, G. (2006):

Turbulence dynamics: an independent predictor of late mortality after acute myocardial infarction.

In: Int. J. Cardiol. 107(1):42-47

Bauer, A.; Malik, M.; Schmidt, G.; Barthel, P.; Bonnemeier, H.; Cygankiewicz, I.; Guzik, P.; Lombardi, F.; Müller, A.; Oto, A.; Schneider, R.; Watanabe, M.; Wichterle, D.; Zareba, W. (2008):

Heart rate turbulence: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use: International Society for Holter and Noninvasive Electrophysiology Consensus.

In: J. Am. Coll. Cardiol. 52(17):1353-65

Bazett, H.C. (1920):

An analysis of the time-relations of electrocardiograms.

In: Heart 7:353-370

Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. (2013):

Stryer Biochemie

In: 7. Auflage, S. 397, Springer Spektrum-Verlag

Berridge, M.J.; Bootman, M.D.; Lipp, P. (1998):

Calcium - a life and death signal.

In: Nature 395(6703):645-48

Bigger, J.T. Jr.; Fleiss, J.L.; Steinman, R.C.; Rolnitzky, L.M.; Kleiger, R.E.; Rottman, J.N. (1992):

Frequency domain measures of heart period variability and mortality after myocardial infarction.

In: Circulation 85(1):164-71

Billaud, M.; Lohman, A.W.; Straub, A.C.; Looft-Wilson, R.; Johnstone, S. R.; Araj, C.A.; Best, A.K.; Chekeni, F.B.; Ravichandran, K.S.; Penuela, S.; Laird, D.W.; Isakson, B.E. (2011):

Pannexin1 regulates α 1-adrenergic receptor- mediated vasoconstriction.

In: Circ. Res. 109(1):80-85

Boassa, D.; Ambrosi, C.; Qiu, F.; Dahl, G.; Gaietta, G.; Sosinsky, G.E. (2007):

Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane.

In: J. Biol. Chem. 282(43):31733-43

Boassa, D.; Qiu, F.; Dahl, G.; Sosinsky, G.E. (2008):

Trafficking dynamics of glycosylated pannexin1 proteins.

In: Cell Commun. Adhes. 15(1):119-32

Brinster, R.L. (1974):

The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development.

In: J. Exp. Med. 140(4):1049-56

Brugada, P.; Brugada, J. (1992):

Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report.

In: J. Am. Coll. Cardiol. 20(6):1391-96

Bruzzone, R.; Hormuzdi, S.G.; Barbe, M.T.; Herb, A.; Monyer, H. (2003):

Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain.

In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(23):13644-49

Bruzzone, R.; Barbe, M.T.; Jakob, N.J.; Monyer, H. (2005):

Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes.

In: J. Neurochem. 92(5):1033-43

Bunse, S.; Haghika, A.; Zoidl, G.; Dermietzel, R. (2005):

Identification of a potential regulator of the gap junction protein pannexin1.

In: Cell Commun. Adhes. 12(5-6):231-36

Bunse, S.; Locovei, S.; Schmidt, M.; Qiu, F.; Zoidl, G.; Dahl, G.; Dermietzel, R. (2009):

The potassium channel subunit Kv β 3 interacts with pannexin 1 and attenuates its sensitivity to changes in redox potentials.

In: FEBS J. 276(21):6258-70

Bunse, S.; Schmidt, M.; Prochnow, N.; Zoidl, G.; Dermietzel, R. (2010):

Intracellular cysteine 346 is essentially involved in regulating Panx1 channel activity.

In: J. Biol. Chem. 285(49):38444-52

Bunse, S.; Schmidt, M.; Hoffmann, S.; Engelhardt, K.; Zoidl, G.; Dermietzel, R. (2011):

Single cysteines in the extracellular and transmembrane regions modulate pannexin1 channel function.

In: J. Membr. Biol. 244(1):21-33

Callaghan, M.A.; O'Hare, B.; Casey, W. (2012):

What other anomalies? Failure to wean post ventricular septal defect repair secondary to anomalous origin of the left coronary artery from the pulmonary artery.

In: Paediatr. Anaesth. 22(5):487-89

Catterall, W.A.; Wisedchaisri, G.; Zheng, N. (2017):

The chemical basis for electrical signaling.

In: Nat. Chem. Biol. 13(5):455-463

Chekeni, F.B.; Elliott, M.R.; Sandilos, J.K.; Walk, S.F.; Kinchen, J.M.; Lazarowski, E.R.; Armstrong, A.J.; Penuela, S.; Laird, D.W.; Salvesen, G.S.; Isakson, B.E.; Bayliss, D.A.; Ravichandran, K.S. (2010):

Pannexin1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis.

In: Nature 467(7317):863-7

Collins, K.A.; Korcarz, C.E.; Lang, R.M. (2003):

Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice.

In: Physiol. Genomics 13(3):227-39

Couette, B.; Marger, L.; Nargeot, J.; Mangoni, M.E. (2006):

Physiological and pharmacological insights into the role of ionic channels in cardiac pacemaker activity.

In: Cardiovasc. Hematol. Disord.-Drug Targets 6(3):169-90

Cygankiewicz, I.; Wranicz, J.K.; Bolinska, H.; Zaslonka, J.; Zareba, W. (2004):

Relationship between heart rate turbulence and heart rate, heart rate variability, and number of ventricular premature beats in coronary patients.

In: J. Cardiovasc. Electrophysiol. 15(7):731-37

Dahl, G.; Keane, R.W. (2012):

Pannexin: from discovery to bedside in 11 ± 4 years?

In: Brain Res. 1487:150-59

De Bakker, J.M.; van Rijen, H.V. (2007):

Electrocardiographic manifestation of anatomical substrates underlying post-myocardial infarction tachycardias.

In: J. Electrocardiol. 40(6 Suppl 1):21-25

Degabriele, N.M.; Griesenbach, U.; Sato, K.; Post, M.J.; Zhu, J.; Williams, J.; Jeffery, P.K.; Geddes, D.M.; Alton, E.W. (2004):

Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction.

In: Exp. Physiol. 89(4):497-505

D'hondt, C.; Ponsaerts, R.; De Smedt, H.; Bultynck, G.; Himpens, B. (2009):

Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions?

In: Bioessays 31(9):953-74

D'hondt, C.; Ponsaerts, R.; De Smedt, H.; Vinken, M.; De Vuyst, E.; De Bock, M.; Wang, N.; Rogiers, V.; Leybaert, L.; Himpens, B.; Bultynck, G. (2011):

Pannexin channels in ATP release and beyond: an unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum.

In: Cell. Signal. 23(2):305-16

Dinarello, C.A. (2005):

Blocking IL-1 in systemic inflammation.

In: J. Exp. Med. 201(9):1355-59

Dolmatova, E.; Spagnol, G.; Boassa, D.; Baum, J.R.; Keith, K.; Ambrosi, C.; Kontaridis, M.I.; Sorgen, P.L.; Sosinsky, G.E.; Duffy, H.S. (2012):

Cardiomyocyte ATP release through pannexin1 aids in early fibroblast activation.

In: Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 303(10):H1208-18

Donner B.C.; Schullenberg, M.; Geduldig, N.; Hüning, A.; Mersmann, J.; Zacharowski, K.; Kovacevic, A.; Decking, U.; Aller, M.I.; Schmidt, K.G. (2011):

Functional role of TASK-1 in the heart: studies in TASK-1-deficient mice show prolonged cardiac repolarization and reduced heart rate variability.

In: Basic Res. Cardiol. 106(1):75-87

Ebihara, L. (2003):

New roles for connexons.

In: News Physiol. Sci. 18:100-03

Epifantseva, I.; Shaw, R. (2017):

Intracellular trafficking pathways of Cx43 gap junction channels.

In: Biochim. Biophys. Acta S0005-2736(17)30179-7

Erdogan, A.; Coch, M.; Bilgin, M.; Parahuleva, M.; Tillmanns, H.; Waldecker, B.; Soydan, N. (2008):

Prognostic value of heart rate variability after acute myocardial infarction in the era of immediate reperfusion.

In: Herzschrittmachertherapie + Elektrophysiologie 19(4):161-68

Ferrera, R.; Larese, A.; Berthod, F.; Guidollet, J.; Rodriguez, C.; Dureau, G.; Dittmar, A. (1993):

Quantitative reduction of MTT by hearts biopsies *in vitro* is an index of viability.

In: J. Mol. Cell. Cardiol. 25(9):1091-99

Fisher, S.G.; Marber, M.S. (2002):

An *in vivo* model of ischaemia-reperfusion injury and ischaemic preconditioning in the mouse heart.

In: Pharmacol. Toxicol. Methods 48(3):161-69

Gaita, F.; Giustetto, C.; Bianchi, F.; Wolpert, C.; Schimpf, R.; Riccardi, R.; Grossi, S.; Richiardi, E.; Borggreffe, M. (2003):

Short QT Syndrome: a familial cause of sudden death.

In: Circulation 108(8):965-70

Gao, X.M.; Dart, A.M.; Dewar, E.; Jennings, G.; Du, X.J. (2000):

Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice.

In: Cardiovasc. Res. 45(2):330-38

Gassmann, O.; Smock, A.; Steinem, C.; Sosinsky, G.E. (2010):

Pannexin1 and pannexin2 channels show quaternary similarities to connexons and different oligomerization numbers from each other.

In: J. Biol. Chem. 285(32):24420-31

Gehrmann, J.; Hammer, P.E.; Maguire, C.T.; Wakimoto, H.; Triedman, J.K.; Berul, C.I. (2000):

Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse.

In: Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 279(2):H733-40

Georgakopoulos, D.; Mitzner, W.A.; Chen, C.H.; Byrne, B.J.; Millar, H.D.; Hare, J.M.; Kass, D.A. (1998):

In vivo murine left ventricular pressure-volume relations by miniaturized conductance micromanometry.

In: Am. J. Physiol. 274(4 Pt 2):H1416-22

Ghuran, A.; Reid, F.; La Rovere, M.T.; Schmidt, G.; Bigger, J.T. Jr.; Camm, A.J.; Schwartz, P.J.; Malik, M.; ATRAMI Investigators (2002):

Heart rate turbulence-based predictors of fatal and nonfatal cardiac arrest (The autonomic tone and reflexes after myocardial infarction substudy).

In: Am. J. Cardiol. 89(2):184-90

Goldberg, G.S.; Bechberger, J.F.; Naus, C.C. (1995):

A pre-loading method of evaluating gap junctional communication by fluorescent dye transfer.

In: Biotechniques 18(3):490-97

Goldstein, D.S.; Benthoo, O.; Park, M.Y.; Sharabi, Y. (2011):

Low-frequency power of heart rate variability is not a measure of cardiac sympathetic tone but may be a measure of modulation of cardiac autonomic outflows by baroreflexes.

In: Exp. Physiol. 96(12):1255-61

Gussak, I.; Brugada, P.; Brugada, J.; Wright, R.S.; Kopecky, S.L.; Chaitman, B.R.; Bjerregaard, P. (2000):

Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome?

In: Cardiology 94(2):99-102

Hagos F.T.; Daood, M.J.; Ocque, J.A.; Nolin, T.D.; Bayir, H.; Poloyac, S.M.; Kochanek, P.M.; Clark, R.S.; Empey, P.E. (2017):

Probenecid, an organic anion transporter 1 and 3 inhibitor, increases plasma and brain exposure of N-acetylcysteine.

In: Xenobiotica 47(4):346-353

Hahn, J.-M. (2013):

Checkliste Innere Medizin

In: 7. Auflage, S.58, Thieme-Verlag

Hanley, P.J.; Kronlage, M.; Kirschning, C.; Del Rey, A.; Di Virgilio, F.; Leipziger, J.; Chessell, I.P.; Sargin, S.; Filippov, M.A.; Lindemann, O.; Mohr, S.; Königs, V.; Schillers, H.; Bähler, M.; Schwab, A. (2012):

Transient P2X7 receptor activation triggers macrophage death independent of Toll-like receptors 2 and 4, caspase-1, and pannexin-1 proteins.

In: J. Biol. Chem. 287(13):10650-63

Hendgen-Cotta, U.B.; Merx, M.W.; Shiva, S.; Schmitz, J.; Becher, S.; Klare, J.P.; Steinhoff, H.J.; Goedecke, A.; Schrader, J.; Gladwin, M.T.; Kelm, M.; Rassaf, T. (2008):

Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury.

In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105(29):10256-61

Henning, W.; Graw, J. (2010):

Genetik

In: 5. Auflage, S.445; 453, Springer-Verlag

Hochman, J.S.; Choo, H. (1987):

Limitation of myocardial infarct expansion by reperfusion independent of myocardial salvage.

In: Circulation 75(1):299-306

Iglesias, R.; Locovei, S.; Roque, A.; Alberto, A.P.; Dahl, G.; Spray, D.C.; Scemes, E. (2008):

P2X7 receptor-pannexin1 complex: pharmacology and signaling.

In: Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 295(3):C752-60

Jong, W.M.; Reitsma, P.H.; Ten Cate, H.; De Winter, R.J. (2003):

Modified two-step model for studying the inflammatory response during myocardial ischemia and reperfusion in mice.

In: Comp. Med. 53(5):522-6

Keating, M.; Atkinson, D.; Dunn, C.; Timothy, K.; Vincent, G.M.; Leppert, M. (1991):

Linkage of a cardiac arrhythmia, the long QT syndrome, and the Harvey ras-1 gene.

In: Science 252(5006):704-6

Kienitz, M.C.; Bender, K.; Dermietzel, R.; Pott, L.; Zoidl, G. (2011):

Pannexin1 constitutes the large conductance cation channel of cardiac myocytes.

In: J. Biol. Chem. 286(1):290-98

Kim, S.C.; Boehm, O.; Meyer, R.; Hoeft, A.; Knüfermann, P.; Baumgarten, G. (2012):

A murine closed-chest model of myocardial ischemia and reperfusion.

In: J. Vis. Exp. (65):e3896

Kleiger, R.E.; Miller, J.P.; Bigger, J.T. Jr.; Moss, A.J. (1987):

Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction.

In: Am. J. Cardiol. 59(4):256-62

Lamkanfi, M.; Mueller, J.L.; Vitari, A.C.; Misaghi, S.; Fedorova, A.; Deshayes, K.; Lee, W.P.; Hoffman, H.M.; Dixit, V.M. (2009):

Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome.

In: J. Cell Biol. 187(1):61-70

Lang, R.M.; Bierig, M.; Devereux, R.B.; Flachskampf, F.A.; Foster, E.; Pellikka, P.A.; Picard, M.H.; Roman, M.J.; Seward, J.; Shanewise, J.; Solomon, S.; Spencer, K.T.; St John Sutton, M.; Stewart, W. (2006):

Recommendations for chamber quantification.

In: Eur. J. Echocardiogr. 7(2):79-108

La Rovere, M.T.; Pinna, G.D.; Maestri, R.; Mortara, A.; Capomolla, S.; Febo, O.; Ferrari, R.; Franchini, M.; Gnemmi, M.; Opasich, C.; Riccardi, P.G.; Traversi, E.; Cobelli, F. (2003):

Short-term heart rate variability strongly predicts sudden cardiac death in chronic heart failure patients.

In: Circulation 107(4):565-70

Liu, G.; Iden, J.B.; Kovithavongs, K.; Gulamhusein, R.; Duff, H.J.; Kavanagh, K.M. (2004):

In vivo temporal and spatial distribution of depolarization and repolarization and the illusive murine T wave.

In: J. Physiol. 555(Pt 1):267-79

Locovei, S.; Wang, J.; Dahl, G. (2006a):

Activation of pannexin1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium.

In: FEBS Lett. 580(1):239-44

Locovei, S.; Bao, L.; Dahl, G. (2006b):

Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap.

In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(20):7655-59

Locovei, S.; Scemes, E.; Qiu, F.; Spray, D.C.; Dahl, G. (2007):

Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex.

In: FEBS Lett. 581(3):483-88

Lohman, A.W.; Weaver, J.L.; Billaud, M; Sandilos, J.K.; Griffiths, R.; Straub, A.C.; Penuela, S.; Leitinger, N.; Laird, D.W.; Bayliss, D.A.; Isakson, B.E. (2012):

S-nitrosylation inhibits pannexin 1 channel function.

In: J. Biol. Chem. 287(47):39602-12

Lorenz, J.N.; Robbins, J. (1997):

Measurement of intraventricular pressure and cardiac performance in the intact closed-chest anesthetized mouse.

In: Am. J. Physiol. 272(3 Pt 2):H1137-46

Lutgens, E.; Daemen, M.J.; De Muinck, E.D.; Debets, J.; Leenders, P.; Smits, J.F. (1999):

Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes.

In: Cardiovasc. Res. 41(3):586-93

Ma, W.; Hui, H.; Pelegrin, P.; Surprenant, A. (2009):

Pharmacological characterization of pannexin-1 currents expressed in mammalian cells.

In: J. Pharmacol. Exp. Ther. 328(2):409-18

MacVicar, B.A.; Thompson, R.J. (2010):

Non-junction functions of pannexin-1 channels.

In: Trends Neurosci. 33(2):93-102

Malik, M.; Bigger, J.T.; Camm, A.J.; Kleiger, R.E.; Malliani, A.; Moss, A.J.; Schwartz, P.J. *et al.* (1996):

Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology.

In: Eur. Heart J. 17(3):354-81

Malik, M.; Wichterle, D.; Schmidt, G. (1999):

Heart rate turbulence.

In: G. Ital. Cardiol. 29(Suppl 5):65-69

Malliani, A.; Pagani, M.; Lombardi, F.; Cerutti, S. (1991):

Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain.

In: Circulation 84(2):482-92

Martelli, D.; Silvani, A.; McAllen, R.M.; May, C.N.; Ramchandra, R. (2014):

The low frequency power of heart rate variability is neither a measure of cardiac sympathetic tone nor of baroreflex sensitivity.

In: Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 307(7):H1005-12

Mersmann, J.; Koch, A.; Tran, N.; Zimmermann, R., Granja, T.F.; Larmann, J.; Herzog, C.; Theilmeier, G.; Bornstein, S.R.; Kirschning, C.J.; Zacharowski, K. (2010):

Toll-like receptor2 signaling triggers fatal arrhythmias upon myocardial ischemia-reperfusion.

In: Crit. Care Med. 38(10):1927-32

Michael, L.H.; Entman, M.L.; Hartley, C.J.; Youker, K.A.; Zhu, J.; Hall, S.R.; Hawkins, H.K.; Berens, K.; Ballantyne, C.M. (1995):

Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model.

In: Am. J. Physiol. 269(6 Pt 2):H2147-54

Millar Instruments Inc., Houston, USA (2008):

Mikro-Tip®-Katheter-Drucksensor Gebrauchsanweisung

Mitchell, G.F.; Jeron, A.; Koren, G. (1998):

Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse.

In: Am. J. Physiol. 274(3 Pt 2):H747-51

Nerbonne, J.M. (2004):

Studying cardiac arrhythmias in the mouse - a reasonable model for probing mechanisms?

In: Trends in Cardiovasc. Med. 14(3):83-93

Newburger, J.W.; Takahashi, M.; Burns, J.C. (2016):

Kawasaki Disease.

In: J. Am. Coll. Cardiol. 12; 67(14):1738-49

Nicotera, P.; Zhivotovsky, B.; Orrenius, S. (1994):

Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis.

In: Cell Calcium 16(4):279-88

Nishida, M.; Sato, Y.; Uemura, A.; Narita, Y.; Tozaki-Saitoh, H.; Nakaya, M.; Ide, T.; Suzuki, K.; Inoue, K.; Nagao, T.; Kurose, H. (2008):

P2Y6 receptor-Galpha12/13 signalling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis.

In: EMBO J. 27(23):3104-15

Nossuli, T.O.; Lakshminarayanan, V.; Baumgarten, G.; Taffet, G.E.; Ballantyne, C.M.; Michael, L.H.; Entman, M.L. (2000):

A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies.

In: Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 278(4):H1049-55

Odeberg, J.; Freitag, M.; Forssell, H.; Vaara, I.; Persson, M.L.; Odeberg, H.; Halling, A.; Råstam, L.; Lindblad, U. (2016):

Influence of pre-existing inflammation on the outcome of acute coronary syndrome: a cross-sectional study.

In: BMJ Open 6(1):e009968

O'Konski, M.S.; White, F.C.; Longhurst, J.; Roth, D.; Bloor, C.M. (1987):

Ameroid constriction of the proximal left circumflex coronary artery in swine. A model of limited coronary collateral circulation.

In: Am. J. Cardiovasc. Pathol. 1(1):69-77

Pacher, P.; Nagayama, T.; Mukhopadhyay, P.; Bátkai, S.; Kass, D.A. (2008):

Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats.

In: Nat. Protoc. 3(9):1422-34

Pachon, R.E.; Scharf, B.A.; Vatner, D.E.; Vatner, S.F. (2015):

Best anesthetics for assessing left ventricular systolic function by echocardiography in mice.

In: Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 15; 308(12):H1525-9

Palmiter, R.D.; Brinster, R.L.; Hammer, R.E.; Trumbauer, M.E.; Rosenfeld, M.G.; Birnberg, N.C.; Evans, R.M. (1982):

Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes.

In: Nature 300(5893):611-15

Pelegrin P.; Surprenant, A. (2006):

Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor.

In: EMBO J. 25(21):5071-82

Penuela, S.; Bhalla, R.; Gong, X.Q.; Cowan, K.N.; Celetti, S.J.; Cowan, B.J.; Bai, D.; Shao, Q.; Laird, D.W. (2007):

Pannexin1 and pannexin3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins.

In: J. Cell Sci. 120(Pt 21):3772-83

Penuela, S.; Celetti, S.J.; Bhalla, R.; Shao, Q.; Laird, D.W. (2008):

Diverse subcellular distribution profiles of pannexin1 and pannexin3.

In: Cell Commun. Adhes. 15(1):133-42

Penuela, S.; Bhalla, R.; Nag, K.; Laird, D.W. (2009):

Glycosylation regulates pannexin intermixing and cellular localization.

In: Mol. Biol. Cell 20(20):4313-23

Petric, S.; Klein, S.; Dannenberg, L.; Lahres, T.; Clasen, L.; Schmidt, K.G.; Ding, Z.;

Donner, B.C. (2016):

Pannexin-1 deficient mice have an increased susceptibility for atrial fibrillation and show a QT-prolongation phenotype.

In: Cell. Physiol. Biochem. 38(2):487-501

Pinto, J.M.; Boyden, P.A. (1999):

Electrical remodeling in ischemia and infarction.

In: Cardiovasc. Res. 42(2):284-97

Piper, W. (2012):

Innere Medizin

In: 2. überarbeitete Auflage, S.155; 166, Springer-Verlag

Poornima, V.; Madhupriya, M.; Kootar, S.; Sujatha, G.; Kumar, A.; Bera, A.K. (2012):

P2X7 receptor-pannexin1 hemichannel association: effect of extracellular calcium on membrane permeabilization.

In: J. Mol. Neurosci. 46(3):585-94

Prasad, A.M.; Inesi, G. (2012):

Analysis of calcium transients in cardiac myocytes and assessment of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase contribution.

In: Myogenesis - Methods in Molecular Biology, Springer Protocols, volume 798, pp 411-421

Pui, K.; Gow, P.J.; Dalbeth, N. (2013):

Efficacy and tolerability of probenecid as urate-lowering therapy in gout; clinical experience in high-prevalence population.

In: J. Rheumatol. 40(6):872-6

Qiu, F.; Dahl, G. (2009):

A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin1 channels by ATP.

In: Am. J. Physiol. Cell Physiol. 296(2):C250-55

Qiu, F.; Wang, J.; Spray, D.C.; Scemes, E.; Dahl, G. (2011):

Two non-vesicular ATP release pathways in the mouse erythrocyte membrane.

In: FEBS Lett. 585(21):3430-35

Redel, A.; Stumpner, J.; Tischer-Zeitz, T.; Lange, M.; Smul, T.M.; Lotz, C.; Roewer, N.; Kehl, F. (2009):

Comparison of isoflurane-, sevoflurane-, and desflurane-induced pre- and postconditioning against myocardial infarction in mice *in vivo*.

In: Exp. Biol. Med. (Maywood) 234(10):1186-91

Redfors, B.; Shao, Y.; Omerovic, E. (2012):

Myocardial infarct size and area at risk assessment in mice.

In: Exp. Clin. Cardiol. 17(4):268-72

Renz-Polster, H.; Krautzig, S. (Hrsg.; 2012):

Basislehrbuch Innere Medizin

In: 5. Auflage, S.60; 70; 197, Urban & Fischer-Verlag

Riley, G.; Syeda, F.; Kirchhof, P.; Fabritz, L. (2012):

An introduction to murine models of atrial fibrillation.

In: Front. Physiol. 3:296

Sahu, G.; Sukumaran, S.; Bera, A.K. (2014):

Pannexins form gap junctions with electrophysiological and pharmacological properties distinct from connexins.

In: Sci. Rep. 14(4):4955

Salto-Tellez, M.; Yung Lim, S.; El-Oakley, R.M.; Tang, T.P.; Almsherqi, Z.A.; Lim, S.K. (2004):

Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: a quantifiable and highly reproducible experimental model.

In: Cardiovasc. Pathol. 13(2):91-97

Sandilos, J.K.; Chiu, Y.H.; Chekeni, F.B.; Armstrong, A.J.; Walk, S.F.; Ravichandran, K.S.; Bayliss, D.A. (2012):

Pannexin1, an ATP release channel, is activated by caspase cleavage of its pore-associated C-terminal autoinhibitory region.

In: J. Biol. Chem. 287(14):11303-11

Schaper, W.; Gottwik, M.G. (Hrsg.; 1981):

Fortschritte in der Kardiologie

Lüderitz, B.: Therapie der Arrhythmien

Echokardiographie

In: Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Herz- und Kreislaufforschung, Band 47, S.246

Schenkel, J. (2006):

Transgene Tiere

In: 2. Auflage, S.1; 39f.; 41ff., Springer-Verlag

Schmidt, G.; Malik, M.; Barthel, P.; Schneider, R.; Ulm, K.; Rolnitzky, L.; Camm, A.J.;**Bigger, J.T. Jr.; Schömig, A. (1999):**

Heart rate turbulence after ventricular premature beats as a predictor of mortality after acute myocardial infarction.

In: Lancet 353(9162):1390-96

Schulte, S.:

Kardiale Phänotypisierung von TASK-1- und Pannexin-1-defizienten Mäusen.

Unveröffentlichte Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen

Schwab, J.O.; Eichner, G.; Shlevkov, N.; Schrickel, J.; Yang, A.; Balta, O.; Lewalter, T.;**Lüderitz, B. (2005):**

Impact of age and basic heart rate on heart rate turbulence in healthy persons.

In: Pacing Clin. Electrophysiol. 28 Suppl. 1:198-201

Sheiban, I.; Fragasso, G.; Rosano, G.M.; Dharmadhikari, A.; Tzifos, V.; Pagnotta, P.;**Chierchia, S.L.; Trevisi, G. (2001):**

Time course and determinants of left ventricular function recovery after primary angioplasty in patients with acute myocardial infarction.

In: J. Am. Coll. Cardiol. 38(2):464-71

Shestopalov, V.I.; Panchin, Y. (2008):

Pannexins and gap junction protein diversity.

In: Cell. Mol. Life Sci. 65(3):376-94

Silverman, W.R.; Locovei, S.; Dahl, G. (2008):

Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin1 channels.

In: Am. J. Physiol. Cell Physiol. 295(3):C761-67

Silverman, W.R.; De Rivero Vaccari, J.P.; Locovei, S.; Qiu, F.; Carlsson, S.K.; Scemes, E.; Keane, R.W.; Dahl, G. (2009):

The pannexin1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes.

In: J. Biol. Chem. 284(27):18143-51

Solomon, S.D.; Glynn, R.J.; Greaves, S.; Ajani, U.; Rouleau, J.L.; Menapace, F.; Arnold, J.M.; Hennekens, C.; Pfeffer, M.A. (2001):

Recovery of ventricular function after myocardial infarction in the reperfusion era: the healing and early afterload reducing therapy study.

In: Ann. Intern. Med. 134(6):451-58

Sosinsky, G.E.; Boassa, D.; Dermietzel, R.; Duffy, H.S.; Laird, D.W.; MacVicar, B.A.; Naus, C.C.; Penuela, S.; Scemes, E.; Spray, D.C.; Thompson, R.J.; Zhao, H.B.; Dahl, G. (2011):

Pannexin channels are not gap junction hemichannels.

In: Channels (Austin) 5(3):193-97

Speerschneider, T.; Thomsen, M.B. (2013):

Physiology and analysis of the electrocardiographic T wave in mice.

In: Acta Physiol. (Oxf.) 209(4):262-71

Statistisches Bundesamt

Gustav-Stresemann-Ring 11

65189 Wiesbaden

<https://www.destatis.de/kontakt/>

Pressestelle, Pressemitteilung Nr. 465 vom 15.12.2015

Stöckigt, F.; Pöhlmann, S.; Nickenig, G.; Schwab, J.O.; Schrickel, J.W. (2014):

Induced and spontaneous heart rate turbulence in mice: influence of coupling interval.

In: Europace 16(7):1092-98

Stypmann, J. (2007):

Doppler ultrasound in mice.

Echocardiography 24(1):97-112

Stypmann, J.; Engelen, M.A.; Troatz, C.; Rothenburger, M.; Eckardt, L.; Tiemann, K. (2009):

Echocardiographic assessment of global left ventricular function in mice.

Lab. Anim. 43(2):127-37

Suzuki, Y.; Yeung, A.C.; Ikeno, F. (2011):

The representative porcine model for human cardiovascular disease.

In: J. Biomed. Biotechnol. 2011:195483

Takagawa, J.; Zhang, Y.; Wong, M.L.; Sievers, R.E.; Kapasi, N.K.; Wang, Y.; Yeghiazarians, Y.; Lee, R.J.; Grossman, W.; Springer, M.L. (2007):

Myocardial infarct size measurement in the mouse chronic infarction model: comparison of area- and length-based approaches.

In: J. Appl. Physiol. 102(6):2104-11

Tang, S.H.; Silva, F.J.; Tsark, W.M.; Mann, J.R. (2002):

A Cre/loxP-deleter transgenic line in mouse strain 129S1/SvImJ.

In: Genesis 32(3):199-202

Thireau, J.; Zhang, B.L.; Poisson, D.; Babuty, D. (2008):

Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide.

In: Exp. Physiol. 93(1):83-94

Thompson, R.J.; MacVicar, B.A. (2008):

Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes.

In: Channels (Austin) 2(2):81-86

Tsujii, N.; Tsuda, E.; Asaumi, Y.; Yamada, O. (2016):

Usefulness of percutaneous transluminal coronary balloon angioplasty for the left coronary artery stenosis 10 years more than after arterial switch operation.

In: Pediatr. Cardiol. 37(4):751-55

Vanden Abeele, F.; Bidaux, G.; Gordienko, D.; Beck, B.; Panchin, Y.V.; Baranova, A.V.; Ivanov, D.V.; Skryma, R.; Prevarskaya, N. (2006):

Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin1.

In: J. Cell. Biol. 174(4):535-46

Vessey, D.A.; Li, L.; Kelley, M. (2010):

Pannexin-1/P2X 7 purinergic receptor channels mediate the release of cardioprotectants induced by ischemic pre- and postconditioning.

In: J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. 15(2):190-95

Vessey, D.A.; Li, L.; Kelley, M. (2011):

Ischemic preconditioning requires opening of pannexin-1/P2X(7) channels not only during preconditioning but again after index ischemia at full reperfusion.

In: Mol. Cell. Biochem. 351(1-2):77-84

Vogt, A.; Hormuzdi, S.G.; Monyer, H. (2005):

Pannexin1 and pannexin2 expression in the developing and mature rat brain.

In: Brain Res. Mol. Brain Res. 141(1):113-20

Qiu, F.; Dahl, G. (2009):

A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin1 channels by ATP.

In: Am. J. Physiol. Cell Physiol. 296(2):C250-55

Weber, K.Z.; Sun, Y.; Katwa, L.C. (1996):

Wound healing after myocardial infarction.

In: Clin. Cardiol. 19(6):447-55

Wichterle, D.; Camm, A.J.; Malik, M. (2004):

Turbulence slope after atrial premature complexes is an independent predictor of mortality in survivors of acute myocardial infarction.

In: J. Cardiovasc. Electrophysiol. 15(12):1350-56

Wilkens, S. (2015):

Structure and mechanism of ABC transporters.

In: F1000Prime Rep. 7:14

Wolfensohn, S.; Lloyd, M. (2003):

Handbook of Laboratory Animal – Management and Welfare

In: 3rd edition, p. 177, Blackwell Publishing

Xu, H.; Guo, W.; Nerbonne, J.M. (1999):

Four kinetically distinct depolarization-activated K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes.

In: J. Gen. Physiol. 113(5):661-78

Zappalà, A.; Li Volti, G.; Serapide, M.F.; Pellitteri, R.; Falchi, M.; La Delia, F.; Cicirata, V.; Cicirata, F. (2007):

Expression of pannexin-2 protein in healthy and ischemized brain of adult rats.

In: Neuroscience 148(3):653-67

Zaragoza, C.; Gomez-Guerrero, C.; Martin-Ventura, J.L.; Blanco-Colio, L.; Lavin, B.; Mallavia, B.; Tarin, C.; Mas, S.; Ortiz, A.; Egido, J. (2011):

Animal models of cardiovascular diseases.

In: J. Biomed. Biotechnol. 2011:497841

Zhang, Y.; Wu, J.; King, J.H.; Huang, C.L.; Fraser, J.A. (2014):

Measurement and interpretation of electrocardiographic QT intervals in murine hearts.

In: Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 306(11):H1553-57

Zhou, J.; Jeron, A.; London, B.; Han, X.; Koren, G. (1998):

Characterization of a slowly inactivating outward current in adult mouse ventricular myocytes.

In: Circ. Res. 83(8):806-14

Zhu, K.F.; Wang, Y.M.; Zhu, J.Z.; Zhou, Q.Y.; Wang, N.F. (2016):

National prevalence of coronary heart disease and its relationship with human development index: A systematic review.

In: Eur. J. Prev. Cardiol. 23(5):530-43

6 Eidesstattliche Erklärung

Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Köln, den 14.10.2017

Sofia Klein

7 Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit und dem Erreichen meines Wegzieles haben viele helfende Hände und Köpfe beigetragen. Einige von ihnen möchte ich an dieser Stelle namentlich erwähnen:

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Joachim Geyer für die Betreuung meiner Arbeit und die Möglichkeit, als externer Doktorand über die Justus-Liebig-Universität Gießen zu promovieren.

Meine Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Birgit C. Donner hat mich in den vergangenen viereinhalb Jahren so begleitet, wie ich es jedem Doktoranden wünschen würde. Ihr danke ich für ihren hundertprozentigen Einsatz, ihr Wissen, ihren Zuspruch, ihre Geduld, ihren Rückhalt und dafür, dass sie für mich den Begriff „Doktormutter“ neu definiert hat.

Herrn Prof. Dr. med. Malte Kelm und Herrn Prof. Dr. med. Marc W. Merx danke ich für das Zustandekommen des Kooperationsprojekts zwischen dem kinder-kardiologischen und dem kardiologischen Institut des UKD und die gute Zusammenarbeit.

Danken möchte ich weiterhin den Teams des kinder-kardiologischen und des kardiologischen Labors des UKD, die mich sehr freundlich in ihre Mitte aufgenommen haben. Ganz besonders hervorheben möchte ich Frau VMTA Stefanie Becher, Frau Dr. rer. nat. Simone Gorreßen und Frau MTA Martina Müller. Alle drei standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und ich habe viel von ihnen gelernt. Keine Frage blieb offen, kein Ergebnis unbesprochen.

Frau Mariam Taleb danke ich für die kurze aber sehr schöne Zusammenarbeit, ihre Unterstützung bei den Genotypisierungen und den EKG-Auswertungen sowie den intensiven Erfahrungs- und Wissensaustausch. Ich werde unsere gemeinsamen Stunden im Labor und vor dem Rechner nicht vergessen.

Auch in der ZETT der HHU haben viele Menschen mein Projekt direkt und indirekt unterstützt. Allen voran möchte ich Frau Elke Niketta meinen Dank aussprechen, weiterhin Frau BTA Sonja Green für die tolle Zusammenarbeit im Rahmen meiner histologischen Arbeiten, Frau Dr. rer. nat. Christina Gougoula, Frau Dr. med. vet. Eva Engelhardt, Herrn Dr. rer. nat. Peter Benten, Frau Skirlo und Frau Trenkel sowie dem gesamten Team.

Mein Interesse für Wissenschaft und Forschung wurde ganz besonders von Herrn Prof. Dr. med. vet. Bernhard Hiebl geweckt. Er hat mir schon während des Studiums die Möglichkeit eröffnet, Einblicke in diesen Arbeitsbereich zu erlangen, und damit den Grundstein für diese Arbeit gelegt. Herzlichen Dank dafür!

Viele Freunde haben meinen Weg begleitet, einige schon von Kindesbeinen an. Ob von Nah oder Fern, jeder von ihnen hat seinen Teil dazu beigetragen, dass ich es bis hierhin geschafft habe. Besonders danken möchte ich meinen Freundinnen Fanny Ebert, Helena Fieseler und Manon Kochan, Lisa Dannenberg, Hanna Kannmacher, Julia Austermann und Sonja Spieckermann, Sonja Leißing und Pauline Meyer zu Bentrop. Herrn Helmut Rams danke ich herzlich für seine Lebensweisheit und seinen Rat in allen Lebenslagen.

Meiner Mitdotorandin Stella Schulte gebührt Dank für die gute Zusammenarbeit „auf den letzten Metern“ und die schönen Stunden am Tag unserer Disputation in Gießen. Bei meinen Kollegen Frau Dr. med. vet. Franziska Barthel, Frau Dr. rer. nat. Melania Akköse und Herrn Dr. rer. nat. Daniel Kulke bedanke ich mich für Ihre Korrekturen und ihre guten Ratschläge.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Sven. Ihm möchte ich vor allem für seine Unterstützung, seine Rücksicht und seine Nachsichtigkeit danken. Meinem Bruder gebührt großer Dank dafür, dass er mir mit seiner ganz fachfremden Sicht auf die Dinge oft die richtigen Denkanstöße gegeben hat. Meinem Vater danke ich dafür, dass er mir sein naturwissenschaftliches Interesse mit auf den Weg gegeben hat, und für die jahrelange finanzielle Unterstützung meiner Ausbildung. Meine Mutter hat seit ich denken kann in jeder Situation hinter mir gestanden und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt. Ihr gilt ein ganz besonderer Dank, der sich an dieser Stelle nicht anders zusammenfassen lässt.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6614-7



9 783835 196614 7